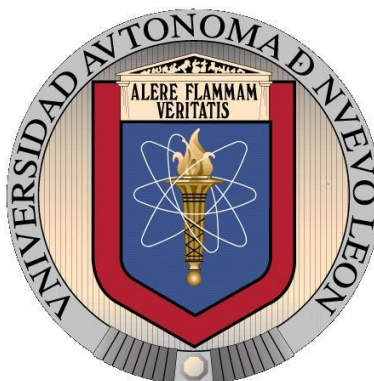


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“IDENTIFICACION DE GENES REGULADOS POR RIM101 EN *Ustilago*  
*maydis*”**

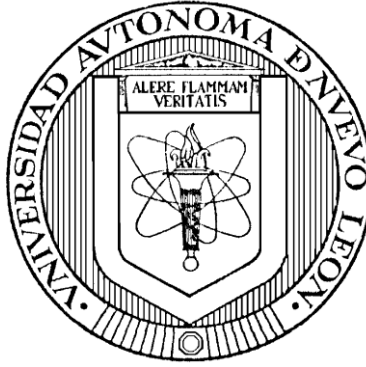
Por

**Q.B.P. EDUARDO FRANCO FRÍAS**

Como requisito parcial para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS** con Acentuación en Microbiología

Diciembre, 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“IDENTIFICACION DE GENES REGULADOS POR RIM101 EN *Ustilago*  
*maydis*”**

Por

**Q.B.P. EDUARDO FRANCO FRÍAS**

Como requisito parcial para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS** con Acentuación en Microbiología

Diciembre, 2009

## **Identificación de Genes Regulados por Rim101 en *Ustilago maydis***

Comité de Tesis

---

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

Directora

---

Dr. José Ruiz Herrera

Director Externo

---

Dr. Juan Manuel Alcocer González

Secretario

---

M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez

Vocal

El presente trabajo fue financiado por Conacyt Mexico, por el Proyecto de Genómica funcional del Sistema de regulación de la Expresión celular por pH ambiental en *U. maydis*, Convenio CB-2008-01, No. de proyecto 106319.

“Recuerda: reflexiona si es de tu interés personal todo aquello que se presente delante de tus ojos. No obedezcas sin criterio ni rigor las exigencias que te impone un sistema dispuesto a dividir, desquiciar y manipular a los individuos con el único fin de lucrar a unos pocos en detrimento de nuestros intereses”.

Anónimo

## **Agradecimientos**

A mi padre, mi madre, mi hermana, mi hermano y a Karina por su apoyo, cariño y comprensión.

A Ada Susana Soto por todo.

A mis Maestros: el M.C. Juan Manuel Adame, la Dra. Elva Teresa Aréchiga y el M.C.

Gerardo Ramos

A mis amigos Efrén, Carlos, Raúl y Patricio por sus consejos.

A Gaby, Cynthia, Diana, Eddy, Rolando, Laura y demás amigos.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. Resumen.....	XIV
2. Abstract.....	XV
3. Introducción .....	1
4. Hipótesis .....	3
5. Objetivos.....	4
5.1.1 Objetivo general.....	4
5.1.2 Objetivos específicos.....	4
6. Antecedentes .....	5
6.1 Generalidades de <i>Ustilago maydis</i> .....	5
6.2 Ciclo de Vida .....	6
6.3 Mecanismos de adaptación al pH ambiental .....	11
6.4 Sistema Pal/PacC(Rim101).....	13
6.5 Conservación de la ruta Rim101 .....	19
6.5.1 Lacasas ( <i>lcc3</i> ).....	23
6.5.2 Proteasa Vacuolar ( <i>prb1</i> ).....	24
6.5.3 Bomba de Sodio ( <i>ena1</i> ).....	24
6.5.4 Factor de Transcripción ( <i>nrg1</i> ) .....	25
6.5.5 Factor de Transcripción ( <i>smp1</i> ).....	25

7. Material y Métodos.....	27
7.1 Cepas de microorganismos .....	27
7.2 Medios de Cultivo de <i>U. maydis</i> .....	27
7.2.1 Solución de Sales.....	27
7.2.2 Preparación de Medio Mínimo pH 3 .....	28
7.2.3 Preparación de Medio Mínimo pH7.....	28
7.2.4 Preparación de Medio Mínimo pH5.....	28
7.2.5 Preparación de Medio Mínimo pH7, pH8, pH10 .....	29
7.2.6 Preparación de Medio Mínimo pH5 con glicerol .....	29
7.2.7 Preparación de Medio Mínimo pH 7, pH 8 y pH 10 con glicerol.....	29
7.2.8 Medio Completo (CM).....	29
7.3 Método de inducción de la miceliación de <i>U. maydis</i> .....	30
7.4 Curva de Crecimiento.....	31
7.5 Extracción de DNA .....	31
7.6 Extracción de RNA .....	33
7.7 Digestión con DNAsa.....	35
7.8 Gel de electroforesis.....	35
7.9 Búsqueda de Genes .....	36
7.10 Gradiente de PCR.....	38
7.11 RT-PCR.....	39
7.12 Densitometria.....	40
7.13 Nomenclatura de Cepas .....	40
8. Resultados .....	41
8.1 Curva de Crecimiento de Crecimiento de <i>Ustilago maydis</i> .....	41



8.2 Extracción de RNA .....	43
8.3 Selección de Genes Regulados por Rim101 .....	44
8.4 Búsqueda de Genes homólogos .....	44
8.5 Estandarización de temperaturas medias .....	52
8.6 Análisis de Expresión de Genes .....	54
8.6.1 Lacasa, <i>Lcc3</i> .....	54
8.6.2 Proteasa Vacuolar, <i>Prb1</i> .....	55
8.6.3 Bomba de Sodio, <i>Ena1</i> .....	57
8.6.4 Factor Transcripcional, <i>Smp1</i> .....	58
8.6.5 Factor Transcripcional <i>Nrg1</i> .....	59
9. Discusión.....	61
10. Conclusión .....	67
11. Literatura Consultada.....	69

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Genes regulados por Rim101 conocidos hasta el momento .....	22
II. Oligonucleótidos usados .....	52

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1.- Curva de crecimiento con glucosa como fuente de carbono .....	41
2.- Caracterización del crecimiento de las cepas silvestre (FB2) y mutante nula $\Delta$ Rim101 (BMA) creciendo en MM a pH 3 y 7 .....	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tumor en la mazorca del maíz.....	5
2. Ciclo de Vida de <i>U. maydis</i> .....	11
3. Vía de activación de Rim101 en <i>Ustilago maydis</i> .....	17
4 Análisis de la calidad de RNA.....	43
5. Estrategia para la identificación <i>in silico</i> de <i>Nrg1</i> en <i>U maydis</i> .....	46
6 Estrategia para la identificación <i>in silico</i> de <i>Smp1</i> en <i>U. maydis</i> . ....	48
7. Estrategia para la identificación <i>in silico</i> de <i>Prb1</i> en <i>U. maydis</i> . ....	50
8. Estrategia para la identificación <i>in silico</i> de <i>Lcc3</i> en <i>U. maydis</i> . ....	51
9 Temperaturas de alineamiento de los genes <i>Prb1</i> , <i>Smp1</i> y <i>Nrg1</i> . ....	53
10. Temperaturas de alineamiento de los Genes <i>Lcc3</i> y <i>Ena1</i> .....	53
11. RT-PCR del gen <i>Lcc3</i> de muestras cultivadas en un medio con glicerol como fuente de Carbono.....	54
12 Análisis de la expresión del gen <i>Prb1</i> . ....	55
13. Análisis de la expresión del gen <i>Prb1</i> de muestras con glicerol como fuente de carbono.....	57
14. Análisis de la expresión del transcrito de <i>Ena1</i> . ....	58
15 Amplificación del transcrito de <i>Smp1</i> .....	59
16.- Amplificación de <i>Nrg1</i> en un medio de cultivo con glicerol como fuente de carbono.....	60

## **NOMENCLATURA**

**°C** Grados centígrados

**µg** Microgramos

**µl** Microlitros

**µg/ml** Microgramos/mililitro

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético

**g** Gramo(s)

**G** Gravedades

**h** Hora(s)

**l** litro

**M** Molar

**min** Minuto(s)

**ml** Mililitro(s)

**mM** Milimolar

**pb** Pares de bases

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDA** Agar papa dextrosa

**RNA** Ácido ribonucleico

**RPM** Revoluciones por minuto

**RT-PCR** Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa

**seg** Segundo(s)

**sp** Especie

**V** Voltios

## 1. RESUMEN

Rim101 (PACC) es un factor transcripcional con dedos de zinc, cuya expresión es dependiente de pH alcalino. Su importancia radica en las funciones que regula, algunas de las cuales han sido descritas solamente en Ascomicetes y Deuteromicetes, incluyendo entre ellas: la síntesis de proteasas, proteínas de la pared celular, genes de floculación, ATPasas, factores de transcripción y regulación de virulencia. Estudios anteriores demostraron (por primera vez en un Basidiomiceto) la presencia de este gen (Rim101) en *Ustilago maydis*. Se encontró que la mutante nula para este gen estaba afectada en la respuesta a estrés iónico, estabilidad de la pared celular y en la morfología. Con el fin de estudiar la actividad regulatoria directa de este factor de transcripción se seleccionaron 5 genes anteriormente descritos como regulados por Rim101 en otros hongos: *Ena1* (bomba de sodio), *Lcc3* (lacasa ácida), *Pbr1* (proteasa vacuolar), *Smp1* (factor de transcripción) y *Nrg1* (factor de transcripción). Se identificaron los genes de dos maneras: 1) *In silico*. Buscamos los genes homólogos en una base de datos, se crearon sondas utilizadas para identificar los genes en el genoma de *U. maydis*. Así se encontró el gen *Nrg1* en una región no anotada del genoma. Una vez identificados los genes en el genoma de *U. maydis*, se diseñaron oligonucleótidos para cada gen. 2) *In vitro*: los oligonucleótidos fueron utilizados para analizar la expresión de los genes bajo diferentes condiciones de cultivo, variando el pH y la fuente de carbono (glucosa y glicerol). Nuestros resultados muestran una poco conocida regulación de la función de Rim101, y provee evidencias de la influencia de otros factores en la respuesta al pH de estos genes.

## 2. ABSTRACT

Rim101 (PacC) is a zinc finger transcriptional factor, whose expression is dependent on alkaline pH. Its importance depends on the functions that it regulates, some of which have been reported only in *Ascomycetes* and *Deuteromycetes*, including: regulation of the synthesis of proteases, cell wall proteins, flocculation genes, ATPases, transcription factors, and regulation of virulence. Previous studies described for the first time its presence in a *Basidiomycete*, *Ustilago maydis*. It was demonstrated that the null mutant was affected in ionic stress response, cell wall stability and morphology. In order to study the direct regulatory activity of this transcriptional factor, we select 5 genes previously reported to be regulated by Rim101 in other fungi: *Ena1* (sodium pump), *Lcc3* (acid laccase), *Pbr1* (vacuolar protease), *Smp1* (transcription factor), and *Nrg1* (transcription factor). We proceeded to identify these genes in two ways: 1) *In silico*. We search for their homologous genes in a database, and created probes to identify them in the *Ustilago maydis* genome. We founded genes in a non annotated region of the genome of *U. maydis*. Once the genes were identified, we designed primers for each one 2) *In vitro*: The primers were used to analyze the expression of the selected genes under different culture conditions: at different pH values and carbon source, glucose or glycerol. Our results show almost unknown aspects of the regulatory functions of Rim101, and constitute evidence that other factors influence the expression of these genes.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos biológica y metabólicamente muy flexibles que degradan y absorben nutrientes a partir de organismos muertos (saprófitos) o vivos (patógenos), y que se pueden adaptar a las condiciones de su medio ambiente, incluso cuando estas son extremas. Esta habilidad para responder a cambios de su medio ambiente es indispensable para asegurar su éxito.

Una de las condiciones ambientales de mayor impacto en la mayoría de los seres vivos es el pH, el cual que puede ser determinante en el crecimiento y la morfología de los hongos (Lamb *et al.*, 2001). El primer hongo en el cual se comenzó a estudiar la adaptación a variaciones en el pH fue *Aspergillus nidulans* que puede crecer en un rango de pH de 2 hasta pH 9. En este hongo se encontró que ciertos genes se expresaban en respuesta a variaciones en el pH y que muchos eran regulados por el factor de transcripción de dedos de zinc llamado *rim101*. (Espeso *et al.*, 2000). Este factor induce la expresión de genes a pH alcalino y reprime los genes expresados a pH ácido (Tilburn *et al.*, 1995). Se sabe que Rim101 regula desde proteasas y bombas de sodio, hasta factores transcripcionales en diversos Ascomicetos y Deuteromicetos (Caracuel *et al.*, 2003; Lamb y Mitchell, 2003; Rollins y Dickman, 2001; Su y Mitchell, 1993). Arechiga-Carvajal y Ruiz-Herrera (2005) aislaron y clonaron el homólogo de *Rim101* en *Ustilago maydis* y generaron mutantes nulas del mismo encontrando que presentaban múltiples cambios en su morfología, tolerancia a estrés salino, secreción de polisacárido al medio y aumento en la deposición de los septos. En base a lo anterior y con la intención de avanzar en el



conocimiento de la actividad regulatoria de Rim101 en Basidiomicetos, en el presente estudio se seleccionaron 5 genes cuyo análisis *in silico* predecía su regulación por Rim101: *Ena1* (bomba de sodio), *Lcc3* (lacasa) *Prb1* (proteasa vacuolar) y *Smp1* y *Nrg1* (factores de transcripción), para analizar su expresión a 4 distintos valores de pH, así como en presencia de distintas fuentes de carbono, encontrando que la regulación de la transcripción.

#### **4. HIPOTESIS**

La vía Pal-Pac/Rim101 regula la expresión de los genes *Smp1*, *Nrg1*, *Ena1*, *Prb1* y *Lcc3* que se encuentran involucrados en diferentes funciones celulares como son: adaptación al estrés salino, ciclo de vida y virulencia.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Identificar genes cuya expresión se encuentre regulada por el factor de transcripción Rim101 como respuesta a variaciones en el pH del medio en *Ustilago maydis*

### **5.2 Objetivos Específicos**

- Diseñar oligonucleótidos para detectar la expresión de genes indicadores de la función de Rim101 en diferentes condiciones del medio.
- Identificar y caracterizar *in silico* genes que posean el consenso del sitio de unión *en cis* del factor de transcripción Rim101 en su región promotora para ser utilizados como indicadores de su función.
- Analizar la influencia de las variaciones del pH del medio en la actividad reguladora de Rim101 sobre la expresión de genes indicadores.

## 6. ANTECEDENTES

### 6.1 Generalidades de *Ustilago maydis*

*Ustilago maydis*, es un basidiomiceto clasificado en el orden de los Ustilaginales de la clase de los Teliomicetos, responsable de la enfermedad denominada carbón común del maíz o huitlacoche, en el maíz (*Zea mays*) y el teozintle (*Z. mays* Subs.*parviglumis* y Subs. *mexicana*) (Fig. 1). Este hongo se ha vuelto un modelo de estudio cada vez más atractivo debido a que su genoma completo ha sido secuenciado (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) y a que las propiedades genéticas del hongo, han permitido determinar muchos elementos que conforman la inmensa red de los mecanismos de adaptación a las condiciones del medio ambiente, del dimorfismo y la virulencia, es por ello que (Bolker, 2001)

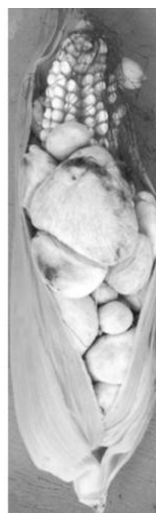


Figura 1. **Tumor en la mazorca del maíz inducida por *U. maydis***. Los tumores han substituido a los granos de maíz, dentro del tejido del tumor existe proliferación del micelio y formación de teliosporas (Kamper *et al* 2006)

## 6.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *U. maydis* es complejo, incluyendo una fase haploide saprofítica y otra dicariótica patogénica (ver revisiones Banuett, 1992; Martínez-Espinoza y Ruiz-Herrera, 1998; Bolker, 2001; Feldbrugge *et al.*, 2004). El ciclo se inicia por la germinación de las basidiosporas haploides que se multiplican por gemación en forma indefinida. El contacto de células haploides sexualmente compatibles, involucra la interacción mediante feromonas, las cuales son percibidas por receptores específicos localizados en la superficie de las células de sexo compatible, dando a lugar a la formación de tubos de conjugación, que conducen a la fusión celular, y a la formación de un micelio dicariótico que puede invadir al tejido vegetal a través de aberturas naturales o por medio de penetración activa mediante la formación de apresorios. El fenómeno de apareamiento, es complejo, ya que su sistema de apareamiento es tetrapolar, estando regulado por dos *loci* llamados *a* y *b*. El *locus a* es bialélico y cada uno contiene los genes que codifican la feromona (*Mfa*) y el receptor de la feromona producida por las células del sexo opuesto (*Pra*). Estos genes regulan el reconocimiento inicial entre las dos levaduras haploides y la fusión celular, lo que estimula la expresión de los genes *b* (Banuett y Herskowitz, 1989).

La transducción de la señal, además de la morfogénesis y la patogenicidad, se encuentran reguladas fundamentalmente a través de dos vías; la vía PKA (de sus siglas en inglés “Protein Kinase A”), dependiente de AMPc y la vía de de MAP cinasas (de sus siglas en inglés Mitogen Activated Protein; revisado por Feldbrugge *et al.*, 2004). Estas dos vías son de amplia distribución en los hongos, habiendo sido descritas originalmente en *S. cerevisiae* (Thevelein y de Winde, 1999; Pan y Heitman, 1999; ver revisiones de Banuett, 1998; Gustin *et al.* 1998). En esta levadura también se han descrito otras cuatro

cascadas o vías de MAP cinasas, que responden a diferentes estímulos del medio ambiente (Gustin *et al.*, 1998). Una vez que se ha recibido la señal de las feromonas, y que se ha transducido a través de las vías mencionadas, la información se conduce hasta el factor de respuesta a feromona (Prfl), éste es capaz de inducir la expresión de genes involucrados en la fusión de ambas células haploides compatibles y de que se lleve a cabo la formación del micelio dicariótico. Posteriormente, el dicarion resultante de ésta fusión, adquiere un hábito de crecimiento en forma de micelio, controlado por el *locus b*, el cual posee cerca de 30 alelos. Este *locus* codifica dos proteínas homeóticas, bE y bW, que forman un heterodímero estable cuando derivan de diferentes alelos (Schultz *et al.*, 1990; Gillissen *et al.*, 1992). La unión del heterodimero bE/bW provoca la detención del ciclo celular del dicarionte (Steinberg *et al.*, 1998), y regula la expresión de *Biz1*, el cual es requerido para el desarrollo patogénico de *U. maydis*. Se cree que la detención del ciclo celular se debe a Biz1 mediante la represión de la expresión de *Clb1* (Flor-Parra, *et al.*, 2006). La importancia de reprimir *Clb1* radica en que codifica una ciclina esencial para la transición de la fase G2/M, la cual inhibe la actividad del heterodimero, y facilita la entrada al ciclo celular durante el crecimiento de las hifas (Scherer M, *et al.*, 2006, Flor-Parra, *et al.*, 2006). Esta detención termina una vez que el dicarionte penetra en la planta huésped.

Durante la infección, *U. maydis* pasa por una transición dimórfica de la forma de levadura a la forma de dicarionte filamentoso, el cual prolifera en el huésped, fenómeno que está regulado mediante señales ambientales y de apareamiento (Boyce *et. Al.*, 2005). Esto da a lugar a la formación de septos que delimitan las células, las cuales posteriormente se redondean y separan para dar lugar a las teliosporas de color negro, que se acumulan en los tumores desarrollados en la planta. Para que ocurra de forma adecuada el correcto desarrollo de la morfología celular y la división de las células haploides, se

requieren diversos genes, como *Sep3* y *Fuz1*, los cuales inducen la diferenciación de la forma de levadura en la micelial y posteriormente la formación de telioesporas y su germinación para producir la progenie haploide meiótica (basidiosporas haploides), con lo cual se completa el ciclo de vida (Boyce *et al.*, 2005, Chew *et al.*, 2008). El gen *Fuz1* aparte de inducir esta diferenciación, es necesario para mantener el crecimiento filamentoso y controla el tamaño de la célula, la localización y número de septos, separación celular y constricción de la región del cuello, así como la integridad de la pared celular y evitar la secreción del pigmento (Chew *et al.*, 2008).

Los dicariontes y el micelio diploides son patogénicos para los huéspedes naturales. Es posible que algunos genes involucrados en la patogénesis puedan ser activados por condiciones especiales de la planta. La virulencia esta también asociada al crecimiento micelial del hongo, habiéndose descrito que mutantes levaduriformes son avirulentas, aunque eran capaces de aparearse (Martínez-Espinosa *et al.*, 1997). Por el contrario, no es una regla que el crecimiento micelial esté acompañado por un comportamiento virulento, las *Uac1* (adenilato ciclasa menos) crecen en forma de micelio pero no son virulentas (Barret *et al.*, 1993). *U. maydis* puede ingresar a la planta a través de heridas o aberturas naturales, pero la Map cinasa Kpp6 parece estar involucrada en la penetración activa mediante la formación de apresorios (Brachmann *et al.*, 2003).

El crecimiento de las hifas dentro de la planta en las etapas iniciales de la invasión ocurre principalmente de forma intracelular (Bannuett y Herskowitz 1996), pero sin afectar el plasmalema (Snetselaar y Mims 1992). Una vez en el periplasma, la planta comienza a defenderse, a través de radicales libres. Molina y Kanhmann (2007) identificaron el gen ortólogo de *Yap1* de *S. cerevisiae* el cual regula la respuesta a estrés oxidativo. Mutantes de

*U. maydis* redujeron su virulencia, lo cual sugiere una posible función como sensor redox que es activado por la formación de un puente disulfuro intramolecular y depende de este sistema en las fases tempranas de la infección donde su presencia permite una colonización más eficiente. *U. maydis* usa *Yap1* como un sistema de desintoxicación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inhibe la NADPH oxidasa de la planta (defensas tempranas), y se requiere para una virulencia completa (Molina y Kamann 2007). Una vez que *U. maydis* se logra establecer en la planta, Cdk5 puede estar involucrado en la correcta síntesis de la pared celular y en el desarrollo de una mayor virulencia (Castillo-Lluvia *et al.*, 2007).

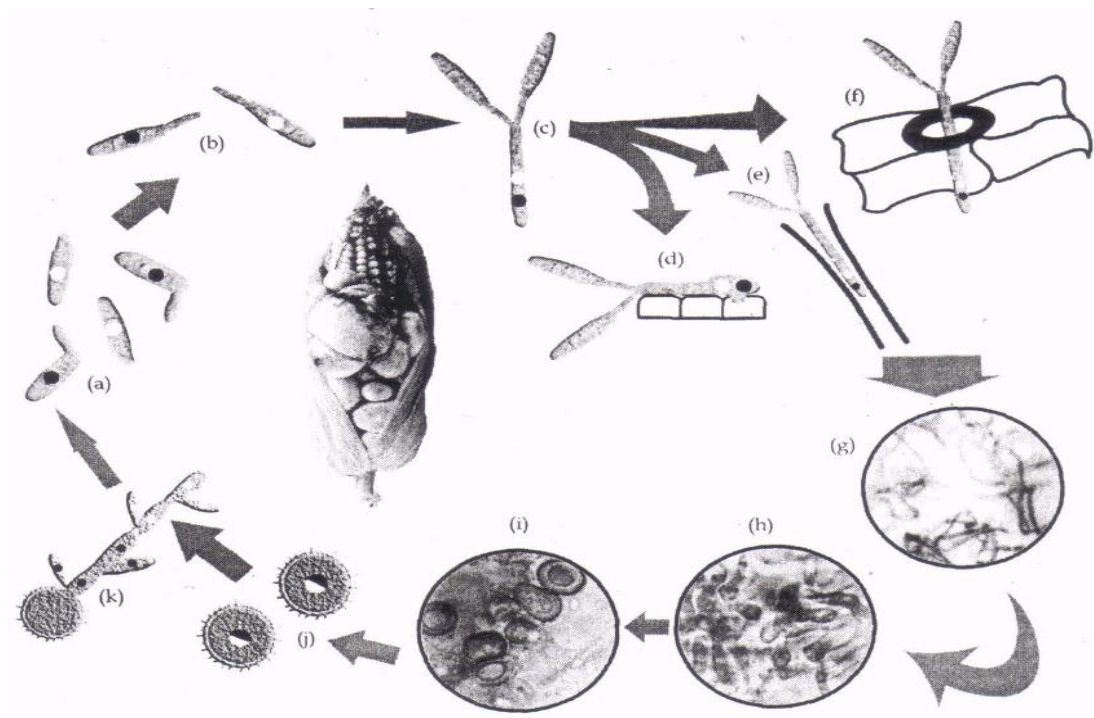
Durante la infección existe un intercambio de información entre ambos miembros del patosistema. De un lado, la etapa de dicarion solo es estable en el huésped natural, y aquí es donde se forman las teliosporas maduras, del otro lado del patosistema, *U. maydis* induce la formación de tumores en la planta huésped. Ruiz-Herrera *et al.*, (1999) lograron desarrollar el crecimiento de *U. maydis* sobre callos embrionarios de maíz separados por una membrana permeable y observaron que el hongo formaba células parecidas a teliosporas, e inducía alteraciones morfológicas en las células de la planta. Estos resultados muestran que el contacto directo entre el hongo y el patógeno no es necesario para los pasos iniciales de los eventos morfogenéticos asociados con la enfermedad y que deben de existir moléculas que informan a ambos lados del patosistema y son responsables de estos eventos. Por otro lado se ha descrito que durante un proceso patogénico el maíz regula la expresión de varios genes de *U. maydis*, algunos de los cuales han sido identificados, entre ellos un grupo de 5 genes homólogos: *mig2-1 a mig2-5*. Estos genes codifican proteínas secretoras cuyo papel todavía es incierto (Basse *et al.*, 2002).

La virulencia parece estar bajo la regulación de algunos sistemas que controlan la



transcripción génica por diferentes mecanismos que afectan la estructura de la cromatina. Mutantes de *U. maydis* en un gen que codifica una histona acetilasa (Gcn5) mostraron ser avirulentas (González-Prieto *et al.*, 2002). También se ha demostrado que la histona desacetilasa Hda1 regula un sistema de genes expresados en la fase dicariótica y estar involucrada en la formación de teliosporas (Reichmann *et al.*, 2002).

Algunos genes requeridos para la patogénesis han sido identificados por REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration). Uno de esos genes, *Glo1*, codifica una glioxal oxidasa, que es una enzima responsable de la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Leuthner *et al.*, 2005). Las mutantes *glo1* no formaban dicariontes filamentosos y eran avirulentas, lo que indica un posible papel de las especies reactivas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la patogénesis. El crecimiento del hongo ocurre principalmente en el tejido meristemático y durante la infección induce la formación del tumor que se llena de teliosporas diploides negras. Estas últimas terminan su desarrollo con la adquisición de una pared celular especializada que es inicialmente hialina y después se vuelve pigmentada y forma proyecciones en forma de espinas. Ya han sido reconocidos diversos pasos que están involucrados en los eventos morfogénicos que llevan a la formación de teliosporas (Banuett 2002; Banuet y Herskowitz 1996). Estos son: a) la ramificación de las hifas, b) la formación de material mucilaginoso que cubre la célula, c) septación del micelio, fragmentación de las hifas y redondeo de las hifas. Algunos de los genes que permiten la diferenciación de la hifa en teliosporas y la germinación de las mismas para producir la progenie haploide meiótica (basidiosporas haploides) que completa el ciclo de vida son *Sep 3* y *Fuz1* (Boyce *et al.*, 2005). Durante este proceso se lleva a cabo la cariogamia con la posterior formación de las teliosporas.



**Figura 2.** Ciclo de vida de *U. maydis*, (a) Esporidia; (b) formación de tubos conjugativos por esporidias sexualmente compatibles; (c) micelio dicariótico formado después de la conjugación; (d-f) penetración de *U. maydis* a los tejidos por tres posibles mecanismos: formación de un apresorio (d), a través de las células (e), y a través de los estomas (f); (g) crecimiento de filamentos en el tejido de la planta; (h) cambios en la morfología celular que deriva en (i) formación de teliosporas; (j) teliosporas diploides; (k) germinación de teliosporas y gemación del promicelio con la formación de basidiosporas. (Banuett, 2002).

### 6.3 Mecanismos de adaptación al pH ambiental

La supervivencia de los microorganismos requiere de mecanismos que regulen la síntesis de moléculas funcionales que se adapten a las condiciones presentes en el medio ambiente. Una de estas condiciones es el pH, la adaptación al cual es de especial interés, ya que los organismos capaces de adaptarse a las variaciones de pH deben de poseer la

capacidad de expresar genes y producir proteínas extracelulares cuya actividad no se vea afectada negativamente por el pH existente y/o por sus variaciones. Algunos hongos poseen una notable capacidad para responder y adaptarse a los cambios de pH en el medio, mediante cambios en su patrón de expresión génica, los cuales llegan a influir en la modificación de su patrón de crecimiento, como es el caso de *C. albicans*, *Y. lipolytica* y *U. maydis*, entre otros.

La vía de respuesta eucariótica mejor entendida actúa a través del factor transcripcional de dedos de zinc Rim101 (PacC) que activa los genes directamente inducidos por pH alcalino en *Aspergillus nidulans*, un hongo que puede crecer en un amplio rango de pH que va desde 2.5 hasta 9.0 (Caddick *et al.*, 1986). Este hongo posee un sistema de regulación de la expresión génica en respuesta al pH que le permite secretar diferentes proteínas citoplasmicas y exo-citoplásmicas funcionales en respuesta al pH del medio. El mecanismo que regula la secreción dependiente del pH está formado por un grupo de proteínas, las cuales han sido también identificadas en la mayoría de las divisiones de los hongos, con al menos 1 representante por división (Aréchiga-Carvajal datos no publicados). La vía de transducción de señales que forman estas proteínas (denominado Pal/Rim) consta, en *A. nidulans*, de los productos de siete genes (revisado por Denison, 2000; Peñalva y Arst, 2002; 2004, Peñalva *et al.*, 2008) descritos más adelante. El sistema Pal/Rim está ampliamente conservado en otros hongos (aunque el número de genes puede variar) y controla la transcripción de genes cuya expresión es dependiente del pH del medio. Como se indicó líneas arriba, su funcionamiento involucra varias proteínas que se denominan Pal (o Rim) y un factor de transcripción que contiene tres dominios de unión a DNA del tipo dedos de Zinc (C2H2) y que se denomina Rim101p (o PacC). Esta proteína de dedos de zinc, fue la primera identificada a través de análisis en

mutantes como un regulador positivo de la expresión de genes meióticos y la esporulación de *Saccharomyces cerevisiae* (Su y Mitchell, 1993). Este factor se activa a pH neutro o alcalino e induce la expresión de diversos genes. Se ha demostrado además que PacC/Rim101 es capaz de regular la expresión de genes a pH ácido.

#### **6.4 Sistema Pal/Rim.**

En un intento por elucidar los mecanismos de regulación de la expresión de genes por el pH, se aislaron varias mutantes de *A. nidulans* que estaban afectadas en su capacidad de secretar la fosfatasa alcalina, lo cual provoca que se comporten como si siempre estuvieran en ambientes ácidos, las cuales se denominaron *pal* (de sus siglas en inglés Alkaline Phosphatase). Además, se identificaron otras mutantes incapaces de sintetizar fosfatasa ácida, las cuales se denominaron mutantes *pac* /de sus siglas en inglés Acid Phosphatase/ (Caddick *et al.*, 1986; Arst *et al.*, 1994).

La vía de traducción de señales Pal/Rim regula la modificación de PacC, siendo esencial su procesamiento proteolítico. (Orejas *et al.*, 1995). Cuando se analizaron las mutantes *pal*, se encontró que eran complementadas por seis diferentes genes que fueron denominados *PalA*, *PalB*, *PalC*, *PalF*, *PalH* y *Pall*. *PalA* posee una posible secuencia de localización nuclear (consenso RRKRRK) y tres posibles motivos SH3 de interacción proteína-proteína (consenso PXXP) (Negrete-Urtasun *et al.*, 1997). Para la activación de PacC (ver más adelante) es necesaria la unión de *PalA* a los dos motivos YPXL/I que se encuentran localizados a los lados del consenso de proteólisis de la proteína (Vincent *et al.*, 2002). En un medio alcalino se altera la superficie del endosoma, favoreciendo la interacción *palA-Snf7* (*Snf7* es una proteína de superficie) y la unión a Rim101 (Boysen *et*

*et al.*, 2006). El producto de *palB* es una cisteína-proteasa de la familia de las calpaínas, la cual puede ser la proteasa de señalización usada en esa vía (Denison *et al.*, 1995; Sorimachi y Suzuki, 2001, Rodríguez-Galán *et al.*, 2009). PalB es reclutada a la membrana endosomal por ESCRT-III mediante una interacción específica con Vps24, activando esta proteasa (Rodríguez-Galan *et al.*, 2009). Los niveles de esta proteína son independientes del pH y la traducción de señal de PAL, es esencial para la señalización de proteólisis, pero no para el procesamiento proteolítico (Peñas *et al.*, 2007). El ortólogo de PalC en *Y. lipolytica* (YIRim23p) es requerido para la respuesta a pH. Al menos uno de sus 142 residuos de la región carboxilo terminal es esencial para su funcionamiento (Negrete-Urtasun, 1999, Blanchin-Roland *et al.*, 2009). Esta proteína posee regiones conservadas con similitudes a BRO1; este dominio está presente en la vía de los cuerpos multivesiculares (MVB), en la proteína Bro1/VPS31 y en la proteína PalA. Ambos interactúan con los componentes de MVB (interactuando con proteínas de la ruta ESCRT-III), lo que refleja una unión entre la respuesta a pH y la endocitosis (Tilburn *et al.*, 2005). *PalF* tiene un marco de lectura abierto de 2325 pb, cuya traducción resulta en una posible proteína de 775 aminoácidos, es un miembro de la familia de las arrestinas, y se une al extremo carboxilo terminal de la proteína PalH, que regula la señalización de pH. (Herranz *et al.*, 2005, Maccheroni *et al.*, 1997). La función de PalF (Rim8) es activar a Rim101p (Davis *et al.*, 2000). La ubiquitinación de PalF es el indicador más confiable de cambio de pH (señalización por pH); esto sucede al unirse al extremo citosólico de PalH, que es requerido para la fosforilación de PalF y su ubiquitinación (Herranz *et al.*, 2005). El producto codificado por *PalH* tiene 760 aminoácidos con siete dominios transmembranales en su región amino terminal, y su extremo carboxilo terminal es hidrofílico, lo que sería de esperarse si esta proteína fuese un receptor unido a la proteína G, y un sensor ambiental de pH. Su localización en la membrana plasmática depende de la co-sobreexpresión de PalI.

La interacción entre PalH y PalF regula la señalización de pH (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2007, Herranz *et al.*, 2005). Por último, el gen *pall* codifica una proteína que tiene tres posibles dominios transmembranales, pero las mutantes en este gen no presentan fenotipos tan evidentes como las afectadas en los genes anteriores (Denison *et al.*, 1998). Pall es una proteína con 3 dominios transmembranales y un péptido señal en el extremo amino terminal. Pall no es esencial para la activación proteolítica de PacC, pero su ausencia reduce marcadamente la acumulación del intermediario proteolítico de 53 kDa inmediatamente después que las células *A. nidulans* se transfieren a pH alcalino (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2007).

Las proteínas Pal existen en 2 complejos separados espacialmente, uno ubicado en la membrana plasmática, formado por PalH, Pall y PalF, y otro endosomal constituido por PalA y PalB al cual pacC es reclutado para su activación proteolítica (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2007). A pH alcalino los productos de los genes *Pal* introducen una modificación, perturbando las interacciones intramoleculares de PacC, permitiendo la proteólisis en una región localizada entre las regiones ricas en prolinas y glicinas y la remoción proteolítica del extremo carboxilo terminal que convierten PacC en su forma funcional (Orejas *et al.*, 1995). A pH alcalino, PacC activa la transcripción de algunos genes (incluyendo *pacC*) y reprime la transcripción de genes normalmente expresados a pH ácido, aunque se han encontrado formas procesadas de Rim101p a pH ácido, sugiriendo la posibilidad de que Rim101p en *C. albicans* tenga funciones independientes del pH alcalino. (Tilburn *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2004,). PacC es un factor de transcripción de 674 aminoácidos con un peso molecular de 72 kDa, el cual posee tres dominios de unión a DNA con dedos de Zinc del tipo Cis2His2 y tres regiones (dominios) de interacción que previenen su procesamiento proteolítico de forma mecánica. Se sabe que en la ausencia de una señalización ambiental

de pH alcalino, el extremo carboxilo terminal regula negativamente la función de PacC y previene su procesamiento. En la ausencia de una señal ambiental de pH, el dominio C-terminal previene una localización nuclear de la versión completa de PacC, en tanto que la forma procesada es casi exclusivamente nuclear, lo que ocurre al aumentar el pH, promoviendo la eliminación proteolítica del extremo C terminal y alcanzarse la conformación abierta. (Mingot *et al.*, 2001) La proteólisis de pacC es sensible a pH y esencial para la regulación de la expresión de genes y depende, como ya se ha descrito, de los genes *Pal*, en su primer corte proteolítico, en tanto que para el segundo corte proteolítico, PacC es un sustrato directo del proteosoma (Orejas *et al.*, 1995, Espeso y Arst. 2000, Hervás-Aguilar *et al.*, 2007). Este procesamiento es necesario para que PacC pueda realizar su actividad como represor y regular procesos fisiológicos y de desarrollo para la patogénesis, ver figura 3 (Lamb y Mitchell, 2003, You y Chung, 2007). Otra ruta de la cual también depende Rim101 para su procesamiento es la vía ESCRT en *Saccharomyces cerevisiae* (Rothfels *et al.*, 2005).





ocurre una segunda proteólisis que parece ser independiente del pH y es catalizada por el proteasoma (Arst y Peñalva, 2003; Hervás-Aguilar *et al.*, 2007). Esta segunda proteólisis elimina 245 residuos del carboxilo terminal de PacC, para dar lugar a la forma activa de éste: PacC<sub>27</sub> de 250 aa (Orejas *et al.*, 1995, Mingot *et al.*, 1999, Diez *et al.*, 2002;). Tanto PacC<sub>53</sub> como PacC<sub>27</sub> muestran una localización preferentemente nuclear, siendo PacC<sub>27</sub> casi exclusivamente nuclear. En relación a ello, se ha demostrado que éstas formas de Rim101/PacC poseen una señal de localización nuclear (NLS), que es separable, pero que se traslapa con el tercer dedo de zinc (Fernandez-Martinez *et al.*, 2003; Mingot *et al.*, 2001). Al realizar mutaciones de *pacC* que afectan la región susceptible a proteólisis, se observó que presentan dos fenotipos diferentes: uno de comportamiento de pH ácido, aún cuando crezcan en medios alcalinos, los cuales se denominan *pacC*; y el otro en que expresan la fosfatasa alcalina (y otras proteínas de expresión susceptible al pH) de forma constitutiva. Esto ocurre cuando las mutaciones dan como resultado una proteína trunca, que ya no posee su dominio regulatorio; éstas mutantes se denominan *pacCc* (Espeso y Arst, 2000). Se observó además en *Aspergillus* y en *Colletotricum* que las mutantes afectadas en este gen, además de que no pueden producir la fosfatasa ácida, estaban afectadas en su conidiación, en la intensidad de su pigmento conidial, en su rendimiento a pH ácido, eran hipersensibles al pH alcalino, y mostraban alteración en la producción de apresorios y germinación, reducción de la virulencia solo en *Colletotricum*, poseen menor actividad de proteasas, incremento en las actividades pectinolíticas y actividades lipolíticas, entre otras funciones (Tilburn *et al.*, 1995, MacCabe *et al.*, 1996; You y Chung, 2007). La proteína Rim101 es capaz de unirse a través de su segundo y tercer dedos de Zinc a una secuencia consenso 5'-TGCCARG-3' del DNA, encontradas en regiones promotoras, que fue identificado por primera vez en el promotor del gen de la sintasa de la N-isopenicilina (*IpnA*) de *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995, Espeso *et al.*, 1997).

## 6.5 Conservación de la vía Pal/Rim

Existe evidencia de la conservación de esta vía en los hongos, ya que se han encontrado genes homólogos de la vía de *A. nidulans* en otros hongos, y se ha demostrado que Rim101 en su versión procesada estimula la expresión de genes que se expresan a pH alcalino, como *IpnA*, y se ha comprobado que reprime la transcripción de genes que se expresan a pH ácido en *A. nidulans* (Espeso y Penalva 1996, Denison 2000). En *S. cerevisiae* se logro demostrar que Rim101, homólogo de PacC, funcionaba como un regulador de diferentes vías, las cuales controlan la tolerancia a iones y la diferenciación celular. Rim101 es un regulador negativo de *Smp1*, cuyo producto regula el crecimiento invasivo haploide, la morfología colonial rugosa y la esporulación, entre otros factores; es un regulador positivo del gen activador de la meiosis *IME1*, o de *VMA4*, aunque los genes inducidos por alteración en el pH no poseen sitios de reconocimiento de Rim101 en sus promotores, sugiriendo que estos son objetivos indirectos (Lamb *et al.*, 2001, Lamb y Mitchell, 2003). También se encontró que regulaba genes de floculación, específicamente *FLO11* [la mutación de Rim101 resulto en una reducción de los niveles de expresión de *FLO11F* (Barrales *et al* 2008)] y otros como el que codifica la de reductasa férrica Frp1 cuya expresión está influenciada por el pH y la concentración de hierro (Liang *et al.*, 2009).

Rim101p es necesario en *S. cerevisiae* para una máxima tolerancia al estrés inducido por cambios en el pH, se requiere para contrarrestar la acidificación citosólica inducida por el ácido propiónico y otros ácidos débiles, y para la apropiada acidificación vacuolar y la estructura de la pared celular. (Mira *et al.*, 2009). Para poder adaptarse a estos cambios, Rim101p en *C. albicans*, regula Phr1 y Phr2, que son 2 glicosidasas de la pared celular, importantes para la adaptación del hongo a hábitats de pH neutro o ácido del humano (Lotz

*et al.*, 2004). Entre los cambios dependientes de pH ocasionados por la mutación de Rim101, se encontró que es responsable del desarrollo de hifas en *C.albicans*, afectando profundamente su desarrollo, la activación de genes involucrados en la formación de hifas, como *HWPI*, *RBT1*, *ALS1* y *ALS5*, pero también reprime genes potenciales de pared celular como son *RBR1*, *RBR2* y *RBR3*, cuyas funciones están siendo investigadas (Barkani *et al.*, 2000, Lotz *et al.*, 2004). En general, las proteínas reguladas por Rim101p se han clasificado en cinco categorías (revisado por Peñalva y Arst, 2004): a) Proteínas secretadas (principalmente enzimas), b) Permeasas, c) Enzimas intracelulares involucradas en la síntesis de metabolitos de exportación, d) Enzimas involucradas en modificaciones post-traduccionales de enzimas secretadas y e) Enzimas que catalizan reacciones exergónicas. Rim101 regula la síntesis de una gran variedad de genes (Tabla 1).

Se ha observado que al regular la síntesis de una gran variedad de proteasas, este factor de transcripción se encuentra involucrado en la virulencia de hongos patógenos. En *Colletotrichum acutatum*, la regulación mediada por KLAP2 (Homólogo de Rim101 en *C. acutatum*) es esencial para controlar la tolerancia a sal, integridad de la pared celular y membranas, y la virulencia. Al controlar la producción de enzimas hidrolíticas, controla la secreción de enzimas degradadoras de la pared celular (CWDEs - cell walldegrading enzymes), regula positivamente el contenido de quitinasa, celulasa, cutinasa, xilanas y actividades de catalasa, y regula negativamente las actividades pectinolíticas y de la endopoligalacturonasa (You y Chung, 2007). En otros hongos patógenos como *Trichophyton rubrum*, la ausencia de Rim101, disminuyó la secreción de proteasas queratinolíticas y la habilidad de crecer en fragmentos de uñas humanas como una única fuente de nutrientes (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006). En *Monacrosporium megalosporum* Rim101 estimula la actividad, a pH alcalino, de la proteasa Spr1 /Proteasa de Serina/ (Kanda *et al.*, 2008). En

*T. harzianum* Rim101 regula quitinasas, proteasas, permeasas de glucosa, proteínas de pared celular y modula su actividad antifúngica (Moreno-Mateos *et al.*, 2007). Las lacasas también son reguladas por Rim101, ya sea reprimiéndolas a pH alcalino, como es el caso de Lcc3, o permitiendo su expresión al mismo pH, siendo el caso de Lcc5, esto en *Fusarium oxysporum* (Cordoba y Roncero, 2008). En *C. albicans*, se ha encontrado que Rim101 es necesario para la patogénesis, regulando proteínas de pared celular, proteasas, entre otros así como para regulando la expresión de genes que estimulan el daño celular dependiente de Rim101 (Davis *et al.*, 2000; Galan *et al.*, 2004; Villar *et al.*, 2007; Nobile *et al.*, 2008).

**Tabla1.** Genes regulados por Rim101 conocidos hasta el momento.

Organismo	pH de expresión	Gen regulado	Proteína	Cita
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Alcalino	<i>xpr2</i>	Proteasa	Madzak <i>et al.</i> , 1999
	Ácido	<i>axp</i>	Proteasa	Young <i>et al.</i> , 1996
<i>Aspergillus nidulans</i>	Alcalino	<i>ipna, sida, mira, y mirb</i>	Permeasa, Genes involucrados en la toma de sideroforos, Isopenicilin N sintasa	Eisendle <i>et al.</i> , 2004
	Ácido	<i>gaba,</i>		Espeso y Arst, 2000
<i>Aspergillus niger</i>	Alcalino	<i>msta</i>	Permeasa	VanKuyk <i>et al.</i> , 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alcalino	<i>yjr061w, smp1, nrg1, prb1, ssn6-tup1</i> , Vía ESCRT	Trasferasas, Factor de transcripción, Proteasa, Adhesinas, Endosomas.	Lamb, and Mitchell. 2003.
<i>Candida albicans</i>	Alcalino	<i>phr1, ena1, pga7/rbt6, skn1, zrt1, cht2, als3, genes sap: sap4, saps y sap6, fre2 y frp1, pra1, aro9, aro10, ker1</i>	Glicosiltransferasas, Quitinasa, Glicoproteínas, Reductasas Ferricas, Proteasas, Factor transcripcional, Transportadores, Biosíntesis de esfingolípidos, Producción de alcoholes aromáticos	Baek 2006
				Davis <i>et al.</i> , 2000
				Lamb, and Mitchell. 2003.
				Nobile <i>et al.</i> , 2008
				Galan <i>et al.</i> , 2004
				Ghosh <i>et al.</i> , 2008
	Acido	<i>phr2</i>		Baek Y.U. <i>et al.</i> , 2008,
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Ácido	<i>acp1</i>	Proteasa	Poussereau <i>et al.</i> , 2001
<i>Monacrosporium megalosporum</i>	Alcalino	<i>spr1</i>	Serin proteasa	Kanda <i>et al.</i> , 2008
<i>Fusarium oxysporum</i>	Alalino	<i>ena1</i>	ATPasa	Caracuel <i>et al.</i> , 2003
		<i>lcc3 y lcc5</i>	Inhibición y sobreexpresión respectivamente	Cordoba and Roncero, 2008
<i>Trichoderma harzianum</i>	Alcalino	<i>chit42, papa, gtt1, qid74</i>	Quitinasa, proteasa, permeasa , proteína de pared celular	Moreno-Mateos, Delgado-Jarana, 2007
<i>Colletotrichum. acutatum</i>	Alcalino	<i>pg, pla, cut1, chit, xyn, lip, cat,</i>	Quitina, Celulosa, cutinasa, xilanasa, actividades de catalasa, Reprime actividades pectolíticas y lipolíticas	

La Tabla 1, muestra una recopilación bibliográfica de los genes que hasta el momento que se sabe son regulados directamente por Rim101, a excepción de *Ena1*, que es regulado por un factor de transcripción, llamado *Nrg1*, que a su vez es regulado por Rim101. A partir de esta información y suponiendo que la tendencia de los hongos a conservar los mecanismos de regulación de la transcripción exitosos está vigente también en *U. maydis*, hemos seleccionado genes que representen cada uno de los grupos de funciones regulados por Rim101 para determinar el grado de conservación de la regulación de su expresión por este factor transcripcional. En este escrito se denominan estos genes como “Marcadores preliminares de la función de Rim101”. Cabe señalar que se seleccionaron 2 factores de transcripción, debido a que regulan genes involucrados en la tolerancia a estrés Salino, y genes de meiosis, una bomba de sodio la cual está involucrada en la resistencia a estrés salino, 1 proteasa seleccionada de forma aleatoria y la lacasa. A continuación se describen brevemente las funciones de estos 5 genes

#### **6.5.1 Lacasas (*Lcc3*)**

Las lacasas son enzimas que contienen cobre, y que oxidan sustratos fenolicos utilizando al oxigeno como aceptor de electrones (Mander *et al.*, 2006). En algunos hongos las lacasas influyen en su virulencia. La localización asociada a la pared celular de la lacasa contribuye a la virulencia de *Cryptococcus sp.* ya que puede interactuar directamente con sustancias extracelulares y/o productos del sistema inmune, sin la necesidad de transportadores citosolicos, aparte de que esta localización permite un mayor acceso a compuestos de fierro (Zhu *et al.*, 2001). En contraste, la inactivación de *Lcc3* (lacasa) en *Fusarium oxysporum* no tuvo efectos detectables en la virulencia en plantas de tomate (Cordoba y Roncero, 2008). El gen de la lacasa *Lcc3*, es inactivado por Rim101 a

pH alcalino en *F. oxysporum*, y su expresión reprimida por glucosa (Mansur *et al.*, 1998; Cordoba y Roncero, 2008)

### **6.5.2 Proteasa Vacuolar (*Prb1*)**

El gen *PRB1* codifica una proteasa vacuolar; Moehle *et al.*, (1987) lograron aislar el gen estructural de *PRB1*. Posteriormente encontraron que esta proteasa necesita ser procesada, lo cual ocurre en el retículo endoplasmico, del cual posteriormente pasa al aparato de Golgi, donde durante su procesamiento se da un evento de glicosilación (Moehle *et al.*, 1989). La expresión del gen *PRB1* en *S. cerevisiae*, es regulado por carbono, nitrógeno y por la velocidad de crecimiento (Naik *et al.*, 1997). La transcripción de *PRB1* es mínima durante el crecimiento exponencial en glucosa, y se incrementa cuando la glucosa se agota (Naik *et al.*, 1997).

### **6.5.3 Bomba de Sodio (*Ena1*)**

Otra de las funciones de Rim101p es activar bombas de iones, promoviendo así la resistencia a concentraciones elevadas de cationes, porque se genera un flujo eficiente a pH alcalino (Caracuel *et al.*, 2003, Lamb *et al.*, 2001). Esto revela que Rim101 tiene un papel más amplio que el de solo promover respuestas inducidas por pH alcalino. Rim101 controla la homeostasis de los iones en *F. oxysporum* a pH alcalino expresando el gen *Ena1*, el cual codifica para una ATPasa de sodio, siendo regulado por 3 rutas, entre ellas la ruta Rim101, la vía Snf, y la ruta de señalización de respuesta a sodio (vía calcineurina). Su actividad responde a una alcalinización intracelular; por lo tanto la expresión de *Ena1* requiere de la combinación de sodio y pH alto. (Platara *et al.*, 2006, Caracuel *et al.*, 2003,

Ruiz *et al.*, 2003). Rim101p reprime a *ENAI*, a través de Nrg1p, promoviendo la resistencia a altas concentraciones de litio y al antibiótico higromicina B en *C. albicans* (Lamb y Mitchell, 2003, Li *et al.*, 2004).

#### **6.5.4 Factor de Transcripción (*Nrg1*)**

Como se indicó en el párrafo anterior, *ENAI* es reprimido por Rim101 a través de Nrg1p, el cual es un factor transcripcional que funciona como un inhibidor de respuestas a pH alcalino, reprime los genes *RSB1* o *FLO11* (Ikeda *et al.*, 2008, Barrales *et al.*, 2008) y activa *RBR1* (Lotz *et al.*, 2004) en *S. cerevisiae*. Nrg1p también regula negativamente al gen *ZPS1*, que es inducido a pH alcalino en el mismo hongo (Lamb y Mitchell, 2003,). Nrg1, aparte de ser regulado por Rim101, también es regulado por la vía del cAMP de varias formas. La proteína Nrg1 contienen una secuencia consenso que es fosforilada y activada por la proteína cinasa dependiente de cAMP PKA (Cramer *et al.*, 2006). Nrg1 ha sido implicado en la represión por glucosa, regulando un grupo de genes de respuesta a estrés (Vyas *et al.*, 2005). Se ha observado que la expresión de Nrg1 es reprimida por la glucosa y que los niveles de la proteína Nrg1 se elevan en respuesta a la limitación de glucosa o fuentes de carbono no fermentables (Berkey *et al.*, 2004).

#### **6.5.5 Factor de Transcripción (*Smp1*)**

*Smp1* es un homólogo de Rlm1p, un factor de transcripción de la familia de los que poseen un motivo MADS, el cual es objetivo de la proteína cinasa C, de la ruta de las MAP cinasas de Integridad celular en *S. cerevisiae* (Dodou, E., y Treisman R. 1997, Nadal *et al.*, 2003). La mutación de *Smp1* ocasiona la muerte celular durante fase estacionaria, regula



negativamente el crecimiento haploide invasivo la morfología colonial rugosa y la esporulación (Lamb y Mitchell 2003, Nadal *et al.*, 2003)

## **7. MATERIAL Y METODOS**

### **7.1 Cepas de microorganismos**

La cepa mutante nula *Arim101* de *U. maydis* BMA, (Arechiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, 2005) y la cepa silvestre de *U. maydis* FB2 (Bannuet y Herskowitz, 1989) usadas en este estudio se conservaron a -70 °C en una mezcla de glicerol y medio de cultivo al 50% v/v. Para reactivarlas, las cepas de *U. maydis* se transfirieron a 15 ml de medio completo (MC, ver la sección medios de cultivo) y se mantuvieron en agitación constante durante 48-72H. Estos cultivos se utilizaron como inóculo para la mayoría de los experimentos. La propagación de las cepas, tanto en forma de levadura como de micelio para *U. maydis*, se realizó en medio mínimo (MM) como se menciona más adelante.

### **7.2 Medios de crecimiento de *U. maydis*.**

#### **7.2.1 Solución de sales de *U. maydis*. (Holliday, 1961)**

Se pesó 16 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g de NaSO<sub>4</sub>, 8 g de KCl, 2 g de MgSO<sub>4</sub>, 1g de CaCl<sub>2</sub> y 8 ml de elementos traza\*. Se disuelven en 1 l de agua destilada. Esterilizar en autoclave.

\* Elementos traza: 60 mg de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 140 mg de MnCl<sub>2</sub> 4(H<sub>2</sub>O), 400 mg de ZnCl<sub>2</sub>, 40 mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2(H<sub>2</sub>O), 100 mg de FeCl<sub>3</sub> 6(H<sub>2</sub>O), 400 mg de CuSO<sub>4</sub> 5(H<sub>2</sub>O). Se disuelven en 1 l de agua destilada. Esterilizar en autoclave.

### **7.2.2 Preparación de Medio Mínimo pH 3 (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995)**

- Se preparó con 10 g de glucosa, 3 g de nitrato de amonio. 62.5 ml de solución de sales de *U. maydis*; agua destilada, hasta 1l.
- Se mezclan las sales y el nitrato de amonio en un poco de agua destilada y se lleva a pH 3 con HCl concentrado.
- Se lleva a un volumen de 500 ml con agua destilada.
- La glucosa se disuelve con agua destilada, se afora a un volumen de 500 ml y se esteriliza por separado en un autoclave.
- Las soluciones de sales y glucosa se mezclan 1:1 v/v al momento de utilizarse.

### **7.2.3 Preparación de Medio Mínimo pH 7 (Holliday, 1961)**

- Se preparó con 10 g de glucosa, 3 g de nitrato de potasio. 62.5 ml de solución de sales de *U. maydis*; agua destilada, hasta 1l.
- Se mezclaron las sales y el nitrato de potasio en un poco de agua destilada y se lleva a pH 7 con NaOH 2N.
- Se llevó a un volumen de 500 ml con agua destilada.
- La glucosa se disolvió con agua destilada, se afora a un volumen de 500 ml y se esteriliza por separado en un autoclave.
- Las soluciones de sales y glucosa se mezclan 1:1 v/v al momento de utilizarse.

### **7.2.4 Preparación de Medio Mínimo pH 5 (variante de Ruiz-Herrera *et al.*, 1995)**

- Se preparó de igual forma que con el Medio Mínimo pH 3, antes mencionado

ajustando el valor de pH a 5, con NaOH 2N.

**7.2.5 Preparación de Medio Mínimo pH 7, pH 8 y pH 10** (variante de Holliday, 1961).

- Se preparó de igual forma que con el Medio Mínimo pH 7, ajustando el pH al valor deseado, ya sea pH 7, pH 8 o pH 10, con NaOH 2N.

**7.2.6 Preparación de Medio Mínimo pH 5 con Glicerol:**

- La preparación es similar a variante del Medio Mínimo pH3, agregando 10ml de glicerol en lugar de los 10g de glucosa.

**7.2.7 Preparación de Medio Mínimo pH 7, pH 8 y pH 10 con glicerol:**

- La preparación es similar a la del Medio Mínimo pH7, agregando 10ml de glicerol en lugar de los 10g de glucosa y ajustando el pH al valor deseado, ya sea pH 7, pH 8 o pH 10, con NaOH 2N.

**7.2.8 Medio completo /MC/ (Holliday, 1961):**

- Se prepararon con 2.5 g de caseína hidrolizada. 10 g de extracto de levadura, 1.5 g de nitrato de amonio, 62.5 ml de solución de sales de *U. maydis*, se lleva el pH a 7 y se llevó a un volumen total de 500 ml con agua destilada.
- En 500 ml de agua destilada se esterilizaron 10g de glucosa. Se esterilizaron ambas

soluciones

### **7.3 Método de inducción de la miceliación de *U. maydis* (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995).**

- Se creció un pre inóculo de *U. maydis* en 15 ml de MC a 28 °C en agitación constante durante 48h.
- Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min.
- Se usan estas células como inóculo para sembrar 250 ml de MC fresco, se incubaron a 28°C durante 18-20 h.
- Se cosecharon las células y se lavaron por centrifugación a 3000 rpm dos veces con agua destilada estéril.
- Se re suspendieron las células en agua desionizada estéril al volumen original (250 ml) del inóculo y se incubaron a 28 °C en agitación por un tiempo mínimo de 2 h y máximo de 4h (Proceso de hambreado).
- Se cosecharon las células por centrifugación y se lavaron dos veces con agua desionizada estéril.
- Se concentraron las células en agua desionizada estéril a un 10% de su volumen original (inóculo).
- Se colocaron en un baño de hielo por 15-30 min antes de su uso. Si no se utilizan en el momento se conservan hasta 48 h a 4 °C.
- El medio de cultivo para la inducción de la miceliación (Medio Mínimo, pH 3) se mantiene a 37°C para dar un choque térmico a las levaduras.
- Se inoculan  $10^6$  células por ml de medio de inducción. El inóculo se mantuvo en agitación a 28 °C durante 20 a 48 h. Desde las 12 h ya se puede observar la miceliación, que desde ese momento es irreversible.

#### 7.4 Curva de Crecimiento

- Se creció un pre-inoculo de *U. maydis*, tanto la cepa silvestre (FB2) como la mutante nula  $\Delta Rim101$  (BMA) en 15 ml de MC a 28°C en agitación constante durante 48h.
- Pasadas las 48h se centrifuga a 3000 rpm durante 5min.
- Se desecha el sobrenadante y la pastilla celular se resuspende en 250ml de MC fresco y se incuba a 28°C durante 24 horas.
- Se realizo el método de inducción de la miceliación de *U. maydis* (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995) antes mencionado
- Se inoculan 1000cel/ml en Medio mínimo a pH5, pH7, pH8 o pH10, dependiendo del pH al cual se realice la curva de crecimiento y se incuba a 28°C.
- Se toma la hora a la cual se inoculo el Medio de cultivo, esta es la hora 0, a partir de la hora 8 se comenzó el Conteo celular.
- El conteo celular se realizo mediante la cámara de Neubauer:
- Se toma 10 $\mu$ l del medio de cultivo y realizando la lectura directamente, se aplicaron diluciones seriadas cuando el conteo celular supero las 300 células. Esto se realizo cada 4 horas a partir de la hora 8.
- Una vez realizada la curva de crecimiento se procedió a seleccionar la hora en la cual la concentración celular fuera mayor a  $1 \times 10^7$  cel/ml. Esto se realizo tanto para la cepa FB2 como para la cepa BMA, a los cuatro pH's.

#### 7.5 Extracción de DNA

La extracción de DNA se baso en una modificación del protocolo de Sambrook y Russell (Sambrook *et al.*, 2001).

- Se realizo un pre-inoculo de 15ml de medio MC y se incubo a 28°C durante 48h con ~150rpm.
- Se centrifugo a 3000rpm por 5min y al pellet celular se le agrego 2ml de Etanol 70%, se realizo un vortex hasta re-suspender la pastilla y se centrifugo a 3000 rpm por 5 min.
- Se re-suspendieron las células en 1ml de Agua bidestilada estéril y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5ml, se volvió a centrifugar por 5min a 3000rpm.
- Se agrego 500 µl de buffer STES (0.2M Tris-Cl pH 7.6, 0.5M NaCl, 0.1% SDS y 0.01M EDTA), 200 µl de buffer TE (pH 7.6) a cada tubo, se respondió el pellet celular y se dejo incubando en hielo durante 7min.
- Se agrego aproximadamente 50 µl de perlas de vidrio y se agitaron en vortex durante 4 min.
- Se agrego 400 µl de fenol:cloroformo (1:1) y se homogenizó la muestra mediante vortex por 1 minuto.
- Se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C por 15 minutos y la fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo.
- Se agregaron 2 volúmenes de isopropanol frío y se mezcló por inversión, se incubo a - 20°C por 20 minutos para precipitar el DNA.
- Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 75% preparado con agua libre de nucleasas.
- Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C.

- Se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla al aire durante 15 a 20 minutos.  
Se re-suspendió cada pastilla en 540 µl de buffer TE pH 7.6 (1mM EDTA, 10mM Tris-HCL) y se agregaron 5 µl de RNAsa a la muestra.
- Se verificó la calidad del DNA en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE, durante 40 min a 80V

## 7.6 Extracción de RNA

Para la extracción de RNAm se usó una modificación al método de TRIZOL, siguiendo las especificaciones del proveedor (MRC Cat.No. TR118) y RNaeasyKit de Qiagen (Cat. No. 74704) que se describe a continuación:

- Se realizó el método de inducción de la miceliación de *U. maydis* (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995) antes mencionado.
- Se inoculó 1000cel/ml en Medio mínimo ya sea a pH5, pH7, pH8 o pH10.
- Se incubó a 28°C durante 22 horas.
- Se centrifugó a 3000rpm por 8 min.
- Se desechó el sobrenadante y se obtuvo la pastilla celular.
- Se congeló el pellet celular con Nitrógeno líquido y se trituro hasta tener un polvo fino.
- Se paso el polvo a tubo Corning de 50 ml
- Se agregó un volumen de TRIzol (Relación 1:1).
- Se agitó vigorosamente hasta homogenizar la muestra.
- Se realizaron alícuotas de 1 ml del homogenizado.
- Se centrifugó a 12,000 g por 15 min (Este paso permite retirar polisacárido, lípidos y



restos celulares).

- Se recupero el sobrenadante y se pasaron a un nuevo tubo, se dejo incubando durante 5 min, entre 15°C a 30°C
- Se añadió 200µl de Cloroformo por cada mililitro de TRIzol.
- Se agito vigorosamente y se dejo incubando durante 5 min, entre 15°C a 30°C.
- Centrifugar a 12,000g durante 10 min.
- Recuperar fase acuosa superior.
- Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadió 0.5 volúmenes de etanol al 100%, mezclar.
- Se transfirió 700µl de la muestra a una columna RNeasy en un tubo de 2 ml, y se centrifuga 15s a 10,000 rpm.
- Repetir pasó 7, hasta pasar totalmente la muestra a la columna.
- Se añadió 350µl del buffer RW1 a la columna de RNAeasy, centrifugar 15 s a 10,000 rpm.
- Se añadió 700 µl de buffer RW1 a la Columna de RNeasy, centrifugar 15 s a 10,000 rpm, desechar los residuos.
- Se añadió 500 µl de buffer RPE a la columna y se centrifugo 15 s a 10,000 rpm.
- Se añadió 500 µl de buffer RPE a la columna y se centrifugo 15 s a 10,000 rpm.
- Se centrifugo 1 min a 10,000 rpm
- Se coloco la columna en un nuevo tubo colector de 1.5ml, y añadir de 50µl de agua libre de RNAsas. Se centrifugo 1min a 10,000rpm a 20°C a 25°C.
- Opcional: Repetir el paso anterior añadiendo otros 50ul de Agua libre de RNAsas o usando el mismo eluente del paso 19 (esto si se requiere una mayor concentración de RNA).
- Se cuantifico el RNA en un nanodrop, leyendo a una ABS de 260 nm, multiplicando el

resultado por 40 y el factor de dilución, el resultado estará en  $\mu\text{g}/\text{mililitro}$ .

### **7.7 Digestión con DNAsa**

- Mezclar 10 $\mu\text{l}$  de Buffer DNAsa I 10X (Tris-Cloro 10mM,  $\text{MgCl}_2$  0.625mM,
- $\text{CaCl}_2$  0.025mM).
- 75  $\mu\text{l}$  de Agua sin nucleasas (Ajustable a la concentración de RNA).
- Agregar 20 $\mu\text{g}$  de RNA (20 $\mu\text{g}$ ) (Volumen variable)
- Agregar 5 $\mu\text{l}$  de DNAsa I (2U/ $\mu\text{l}$ , Marca UsBiological, No. de
- Catalogo D3200-02)
- Incubar a 37°C durante 30min.
- Calentar a 70°C por 5 min.
- Dejar enfriar en hielo (Choque frío)
- Guardar a -80°C.

### **7.8 Gel de electroforesis**

- Pesar 1.5gr de agarosa y disolverla en 80ml Agua DEPC (Puede ser Buffer TAE), agregar 10 ml de Buffer MOPS 10X (Mops 400mM, Acetato de Sodio 100mM y EDTA pH8 10mM) al 1X y Formaldehido al 1%.
- Vaciar en el molde y dejar enfriar.
- Prepara la muestra de la siguiente forma:

Reactivo	Volumen
Formamida desionizada	7.5 µl
MOPS 10X	1.5 µl
Formaldehido	2.4 µl
Agua DEPC	3.6 µl
RNA (3µg)	15 µl
Volumen Final	30 µl

\*Volumen ajustable a la concentración del RNA

- Incubar 5min a 65°C
- Enfriar en Hielo
- Agregar 5µl de Buffer de carga (6X)
- Agregar 1µl de Bromuro de Etidio (10mg/ml) Correr a 70 Volts durante 40 min.

## 7.9 Búsqueda de Genes en *U. maydis*

Se procedió a la búsqueda de los genes “Marcadores preliminares de la función de Rim101” *Ena1*, *Nrg1*, *Smp1*, *Pbr1* y *Lcc3* en la base de datos de proteínas del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein&cmd=search&term=](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein&cmd=search&term=)), seleccionando secuencias aminoacídicas, reportadas en diversos hongos, para cada gen. La selección de proteínas se baso en los siguientes criterios: evitar el uso de proteínas hipotéticas, seleccionar proteínas cuya función haya sido comprobada experimentalmente, el tamaño de la secuencia aminoacídica de las proteínas se mantenga constante entre las diversas secuencias seleccionadas, que las secuencias provengan de hongos.

Una vez localizados genes homólogos se procedió a realizar un alineamiento múltiple con el programa Bioedit, se localizaron regiones conservadas para cada proteína

en particular. Esta región conservada se uso como sonda para la búsqueda de los homólogos en el genoma de *Ustilago maydis* usando la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=5270](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=5270)) o la base de datos del Instituto Broad ([www.broadinstitute.org/annotation/genome/ustilago\\_maydis/Home.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/ustilago_maydis/Home.html)). Una vez localizadas secuencias con similitudes respecto a las sondas, siendo esto la primera prueba de homología, se realizaron búsquedas de marcos de lectura abiertos. Para adquirir más pruebas de homología se sometió a un “blast”, el cual es una herramienta de alineamientos básicos que encuentra similitudes entre secuencias, estos marcos de lectura abiertos contra la base de datos general del NCBI (mencionada anteriormente), corroborando su homología con genes identificados y reportados

Una vez caracterizada la secuencia seleccionada y habiendo reunido suficiente información para deducir su homología con respecto a los genes regulados por Rim101, se procedió la caracterización *in silico* de elementos estructuralmente conservados en cis, dentro de la región promotora, específicamente el sitio de unión de Rim101 ( 5'-GGGCATTCTTGGC-,3), en su posible región promotora. Ubicamos el promotor mediante el uso del programa Bioedit ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)), tomando 2000 pb río arriba del inicio del ORF de la secuencia en cuestión. Posteriormente se ubicaron las secuencias homólogas in cis al sitio de unión de Rim101.

Una vez localizados los sitios de unión de Rim101 al genoma se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación del ARN mensajero usando el programa de diseño de oligonucleótidos del NCBI llamado “primer blast” ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)). Para

comprobar su eficiencia, se determinó su  $\Delta G$  con el programa “OligoAnalyzer v3.0” ([www.idtdna.com/ANALYZER/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx](http://www.idtdna.com/ANALYZER/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx)), buscando una  $\Delta G$  menor a -6 en las hetero-dimerizaciones, y una  $\Delta G$  menor a -3 en las homo-dimerizaciones.

## 7.10 Gradiente de PCR

Se realizó la siguiente mezcla de PCR:

Reactivo	Volumen
Buffer de PCR 10X	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Oligonucleótido Sentido (200ng/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Oligonucleótido Anti-Sentido (200ng/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Polimerasa	0.5 $\mu$ l
DNA (200ng)	2 $\mu$ l
Agua	16 $\mu$ l
Volumen Final	25 $\mu$ l

Se realizó el siguiente programa de PCR:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min	1
95°C	1 min	30
51°C a 61°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	4 min	1

Se cargaron las muestras en un Gel de Agarosa al 2%, se corrió durante 40 min a 80

Volts

## 7.11 RT-PCR

Para la reacción de RT-PCR se uso el kit I-script One-Step RT-PCR kit (BioRad, No. de Catalogo: 170-8894), debido a su sensibilidad.

Reactivo	Volumen
2X RT-PCR	25 µl
Oligonucleótido Sentido	1 µl
Oligonucleótido Anti-Sentido	1 µl
Agua Libre de Nucleasas	17ul
RNA (1µg)	5ul
Transcriptasa reversa iScript	1 µl
Volumen final	50 µl

Se uso el siguiente programa:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Síntesis de cDNA	50°C	10 min	1
Inactivación de la Transcriptasa reversa	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	1 min	30
Alineamiento	*	1 min	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	4 min	1

\*Ver la tabla 2 para la temperatura media de cada par de oligonucleótidos usados, en la sección de resultados.

### **7.12 Densitometría**

Se utilizó un el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Antes de realizar el análisis con este programa se selecciono la imagen deseada, y se procedió a cambiar los colores a una escala de grises y posteriormente invirtiendo los colores mediante el uso de un programa de procesamiento de imágenes (Photoshop C4). Como control de carga se usaron los datos obtenidos para el gen de actina.

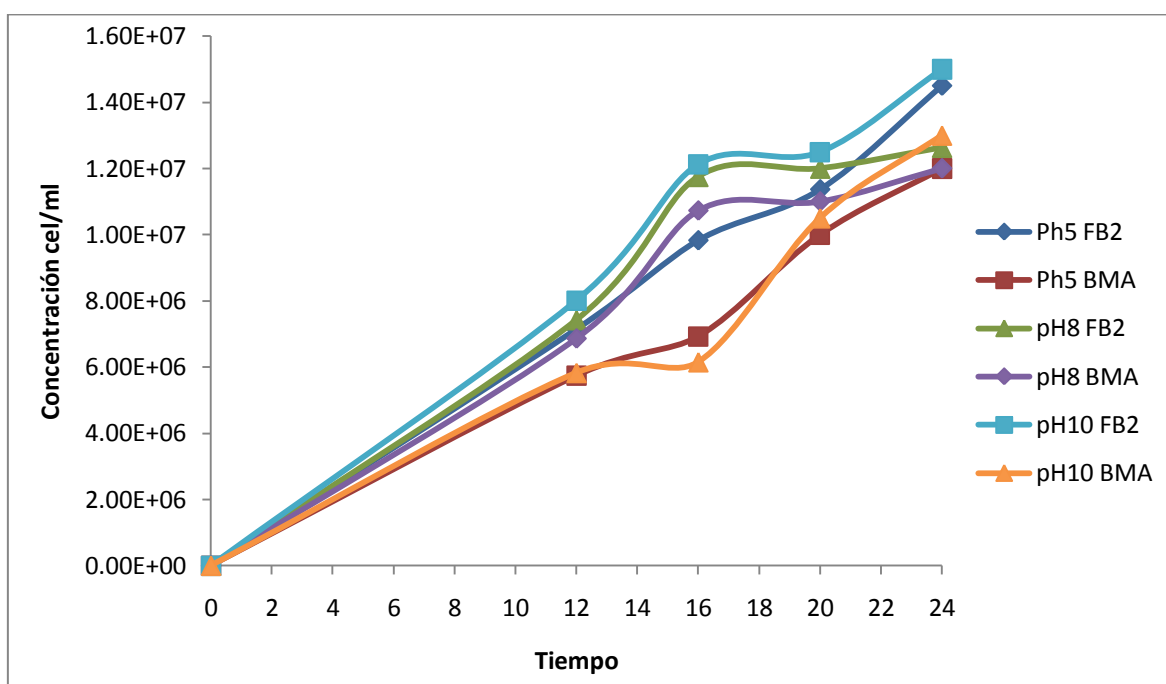
### **7.13 Nomenclatura de cepas.**

Para facilitar la identificación de las muestras se procedió abreviarlas de la siguiente manera: FB2, F; BMA, B; seguida del valor de pH en unidades enteras. Las células cultivadas en glicerol por 16h a pH 7 se abreviaron como F7G16.

## 8. RESULTADOS

### 8.1.- Curva de Crecimiento de *U. maydis*.

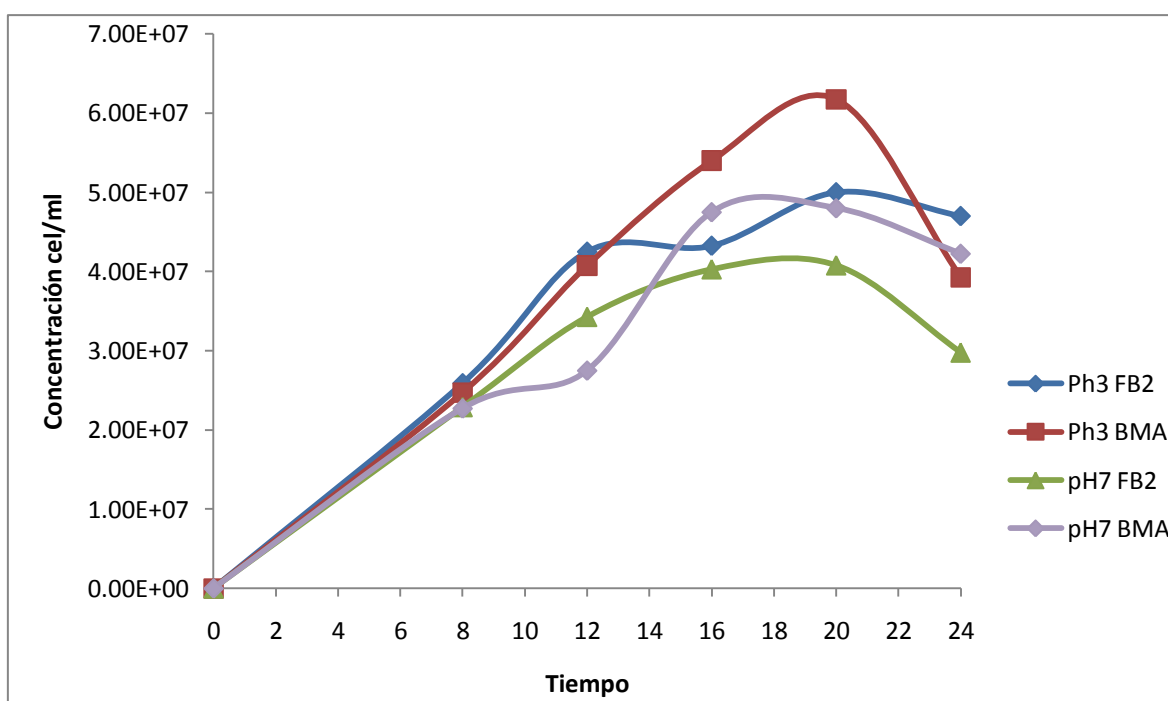
La grafica 1, muestra la curva de crecimiento de las cepas BMA y FB2 de *U. maydis* con glucosa como fuente de carbono y bajo 4 valores de pH. Se selecciono para la extracción de RNA un tiempo de 22h, donde las cepas muestran una concentración celular superior a  $1 \times 10^7$  cel/ml y la producción de polisacárido de parte de la cepa BMA no interfiere con la extracción de mismo.



**Grafica 1. Curva de crecimiento con glucosa como fuente de carbono.** Tanto la cepa FB2 como la BMA alcanzaron una concentración celular de  $1 \times 10^7$  cel/ml. Se seleccionó la hora 22 para realizar la extracción de RNA.



Al igual que con la curva de crecimiento de 24 horas con glucosa, en la de glicerol se realizaron lecturas cada 4 horas, esto solo con 2 pH's, pH 3 y pH 7. No se realizaron curvas de crecimiento en el resto de pH's debido a la poca variación en las concentraciones celulares entre los diferentes pH's. Los análisis realizados nos dieron como resultado, la hora 16 (Grafica 2), con una concentración celular superior al  $4 \times 10^7$  cel/ml para realizar la extracción de RNA debido a que es el punto medio de la fase logarítmica en las cepas a ambos pH's.



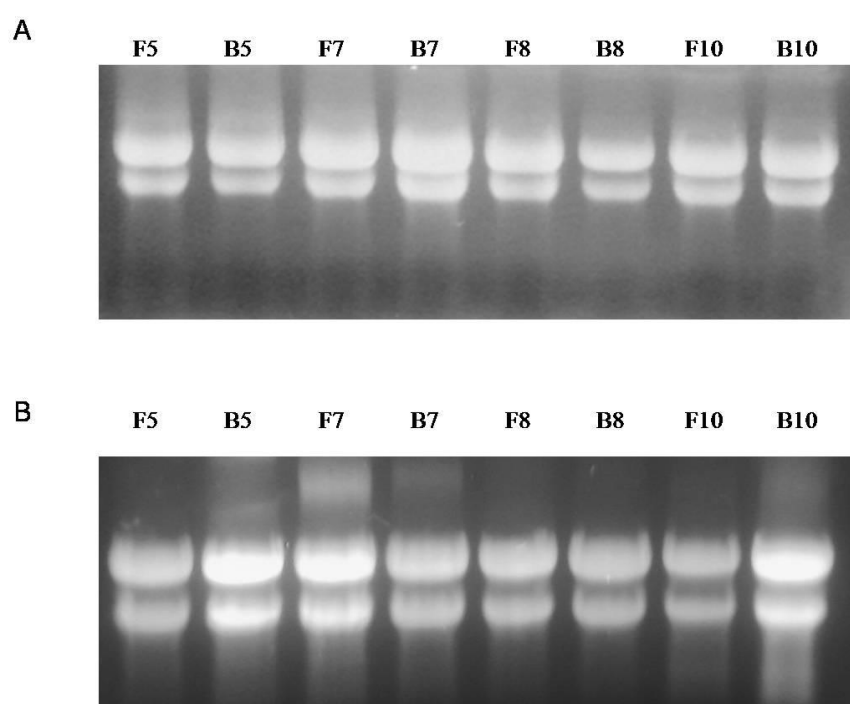
**Grafica 2.- Caracterización del crecimiento de las cepas silvestre (FB2) y mutante nula  $\Delta$ Rim101 (BMA) creciendo en MM a pH 3 y 7. Se seleccionó un tiempo de incubación de 16h para realizar la extracción de RNA.**

Algo de notar es el hecho que las cepas FB2 y BMA en glucosa a pH 7 presentan un crecimiento más lento que el presentado al crecer en glicerol bajo el mismo pH. Al analizar a la misma hora el crecimiento en glicerol o glucosa de ambas cepas se observó un

crecimiento más rápido en glicerol que en glucosa.

## 8.2.- Extracción de RNA

Ya determinada la duración de la fase logarítmica de *U. maydis* en los distintos medios de cultivo, procedimos a realizar la extracción de RNA usando la técnica descrita en la sección de Métodos. En la figura 4 A y B se muestra el resultado de la extracción de RNA de las muestras en glucosa y glicerol, respectivamente, se observan las bandas 16S y 28S sin degradación. Este gel nos dio la pauta para proseguir con la selección de los genes.



**Figura 4. Análisis de la calidad del RNA.** A) Se observan las bandas 16S y 28S, no mostrando degradación, de las muestras cultivadas en glucosa como fuente de carbono, B) RNA de muestras provenientes de un medio con glicerol como fuente de carbono, mostrando las bandas de RNA ribosomal 16S y 28S.

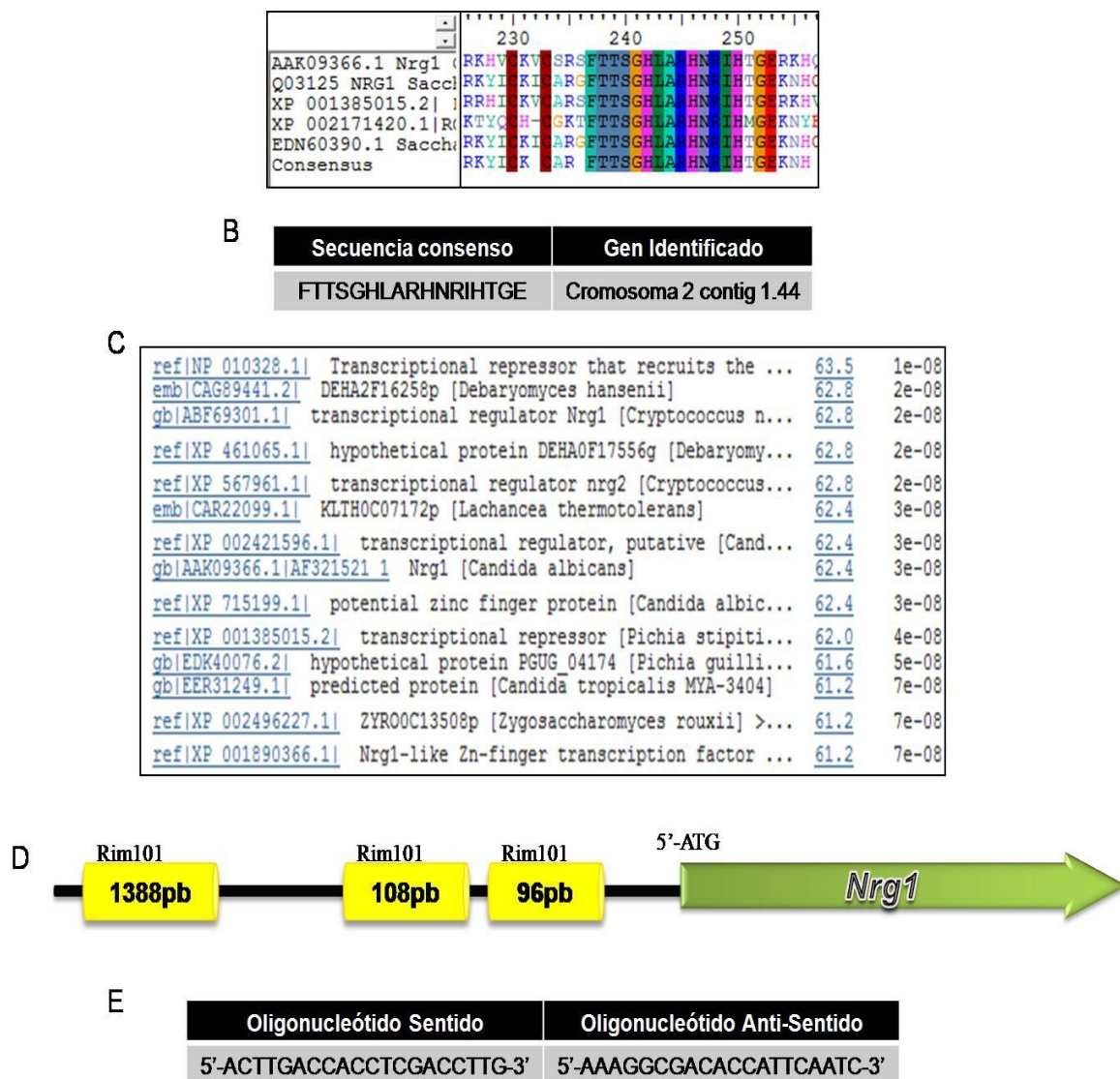
### 8.3.- Selección de Genes regulados por Rim101

La lista de genes seleccionados se muestra en la Tabla 1. El análisis de estos datos muestra que Rim101 regula la expresión génica a 2 niveles: 1) regula genes involucrados en el metabolismo general de la célula, como lo son genes que codifican proteasas, factores de floculación, bombas de sodio, permeasas, reductasas, y 2) controla la expresión de diversos factores de transcripción, como *Nrg1* y *Smp1*. En base a esta información tal como ya se mencionó, se seleccionaron 3 genes que se utilizaron como “Marcadores preliminares de la función de Rim101” que están involucrados con el metabolismo general de la célula: la proteasa vacuolar *Prb1*, la lacasa *Lcc3* y una bomba de Sodio *ena1*. Los otros 2 genes seleccionados se encuentran involucrados en la regulación de la expresión génica, estos fueron los factores transcripcionales *Nrg1*, regula la resistencia a estrés iónico, y *Smp1*, regula genes relacionados con la regulación de la meiosis (Lamb and Mitchell, 2003).

### 8.4.- Búsqueda de Genes homólogos

Para el gen *Ena1* existe un reporte previo de su identificación en *U. maydis* por Begoña *et al.*, (2009) (No. De Acceso FM199940.1), solo se corrobora, por medio de un “blast” su presencia su presencia en el genoma de *U. maydis*, localizándolo en el cromosoma 1. Una vez seguros de la presencia del posible de *Ena1* en el genoma de *U. maydis*, diseñamos oligonucleótidos para su detección. Para ello se procedió al diseño de los oligonucleótidos, llamados PFENA y RENANEW, usando el programa Primer-Blast del NCBI eligiendo el oligonucleótido de menor  $\Delta G$  y con una TM no mayor a 60°C (Tabla 2).

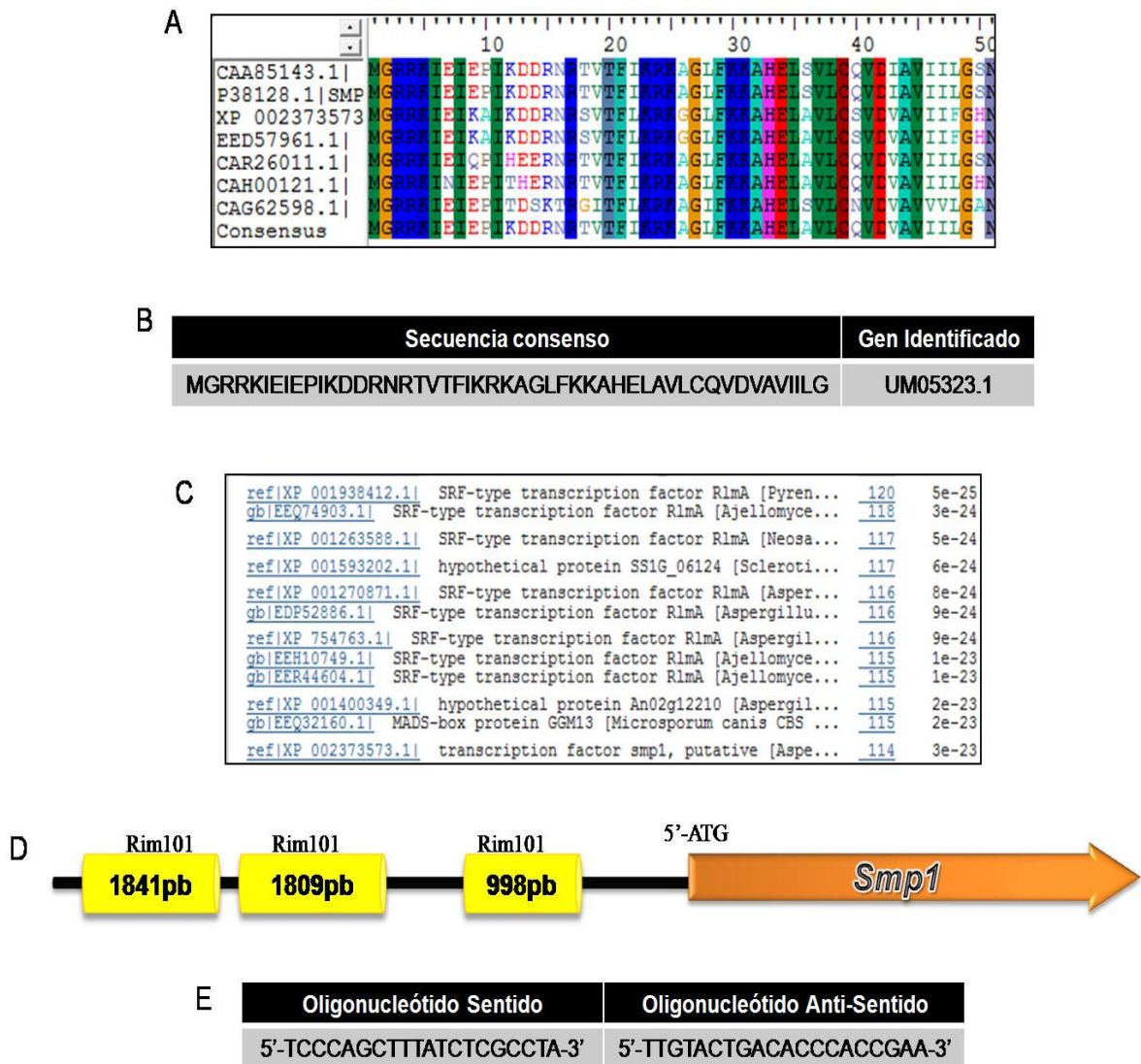
En el caso de *Nrg1* se usaron secuencias homólogas a la proteína Nrg1, la Figura 5a muestra la región conservada de Nrg1p usada como sonda en base a regiones conservadas, utilizándola como anzuelo *in silico* para realizar una búsqueda de la secuencia homóloga en el genoma de *U. maydis* mediante BLAST obteniendo una hibridación positiva en el Cromosoma 2, específicamente en el contig 1.44scaffold2 (Figura 5b). Se seleccionaron 2000pb hacia la región 5' y 3' a partir de la región procediendo a identificar marcos de lectura abiertos con el programa ORF Finder ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/)), encontrando un probable ORF de 2949pb, el cual generó un alineamiento del nucleótido 2162 al 2419. Esto y la presencia de un codón de inicio alternativo nos llevo a buscar un segundo marco de lectura abierto dentro de esta secuencia, encontrando otro de 649pb, presentando una alta similitud con proteínas homólogas de Nrg1, descritos en algunos hongos como: *C. albicans* o *Cryptococcus sp.*, entre otros (Figura 5c). Se procedió a buscar el sitio de unión de Rim101, encontrando 3 sitios probables de unión de Rim101 al genoma a 96pb, 108pb y 1388pb río arriba del codón de inicio de la transcripción (Figura 5d). Ya seguros de la probable homología con el gen *Nrg1* y de su posible regulación por Rim101 se procedió a generar oligonucleótidos específicos para amplificar el transcrito de *Nrg1* (Figura 5e), llamados NRGRNAF y RNANRGR.



**Figura 5. Estrategia para la identificación *in silico* de *Nrg1* en *U. maydis*.** A) Alineamiento múltiple de *Nrg1* identificada a partir de secuencias homólogas descritos en otros hongos, B) Sonda e identificación de la región en el genoma donde probablemente se localice el gen *Nrg1*, C) “Blast” contra la base de datos de proteínas del NCBI de la secuencia identificada como probable *Nrg1* en *U. maydis* para corroborar que el ORF localizado se alinee con secuencias ya descritas para *Nrg1*, D) Sitios de unión de Rim101 hacia la región 5’ del ORF, identificando 3 regiones a 96pb, 108pb y 1388pb, E) Oligonucleótidos usados para amplificar el probable transcrito de *Nrg1*.

La búsqueda de los genes restantes procedió de forma similar al protocolo mencionado en material y métodos. La figura 6 muestra un alineamiento múltiple de genes homólogos a *Smp1* descritos en diversos hongos, obteniendo una secuencia consenso, la cual se usó como sonda contra el genoma de *U. maydis*, alineándose con el gen UM05323.1 (Fig. 6b). Se realizó un alineamiento en la base de datos de proteínas del NCBI con proteínas homólogas de *Smp1*, en *Aspergillus* y *Ajellomyces*, entre otros (Fig. 6c).

Ya identificado el probable gen, se comprobó la regulación por Rim101, determinando su sitio de unión en la zona regulatoria del gen, encontrando 3 sitios de unión localizadas a 998pb, 1809pb y 1841pb hacia la región 5' del codón de inicio de la transcripción (Fig. 6d). A partir del transcrito se procedió a diseñar los oligonucleótidos llamados RNASMP1F y SMP1RNAR (Fig. 6e).

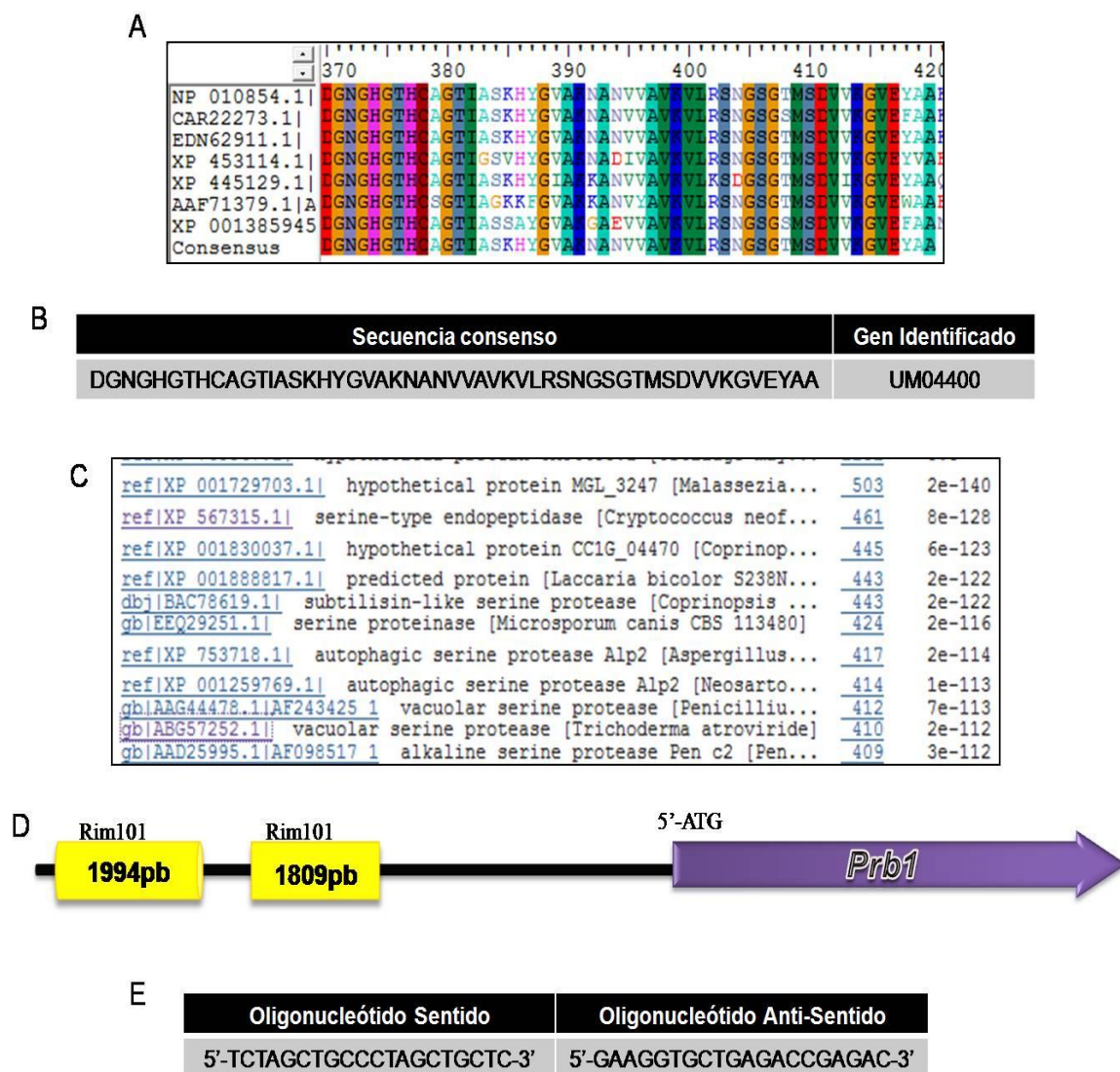


**Figura 6. Estrategia para la identificación *in silico* de *Smp1* en *U. maydis*.** A) Secuencia consenso de *Smp1* obtenida a partir los alineamientos entre las secuencias homologas descritas en otros hongos, B) Secuencia consenso e identificación del probable homólogo de *Smp1* en *U. maydis*, C) Resultado del “Blast” efectuado en la base de datos de proteínas del NCBI para corroborar que el marco de lectura abierto localizado se alinee con secuencias ya descritas para *Smp1*. D) Sitios de unión de Rim101 hacia la región 5’ del ORF, identificando 3 sitios a 998pb, 1809pb y 1841pb, E) Oligonucleótidos diseñados para amplificar el transcrito de UM05323.1

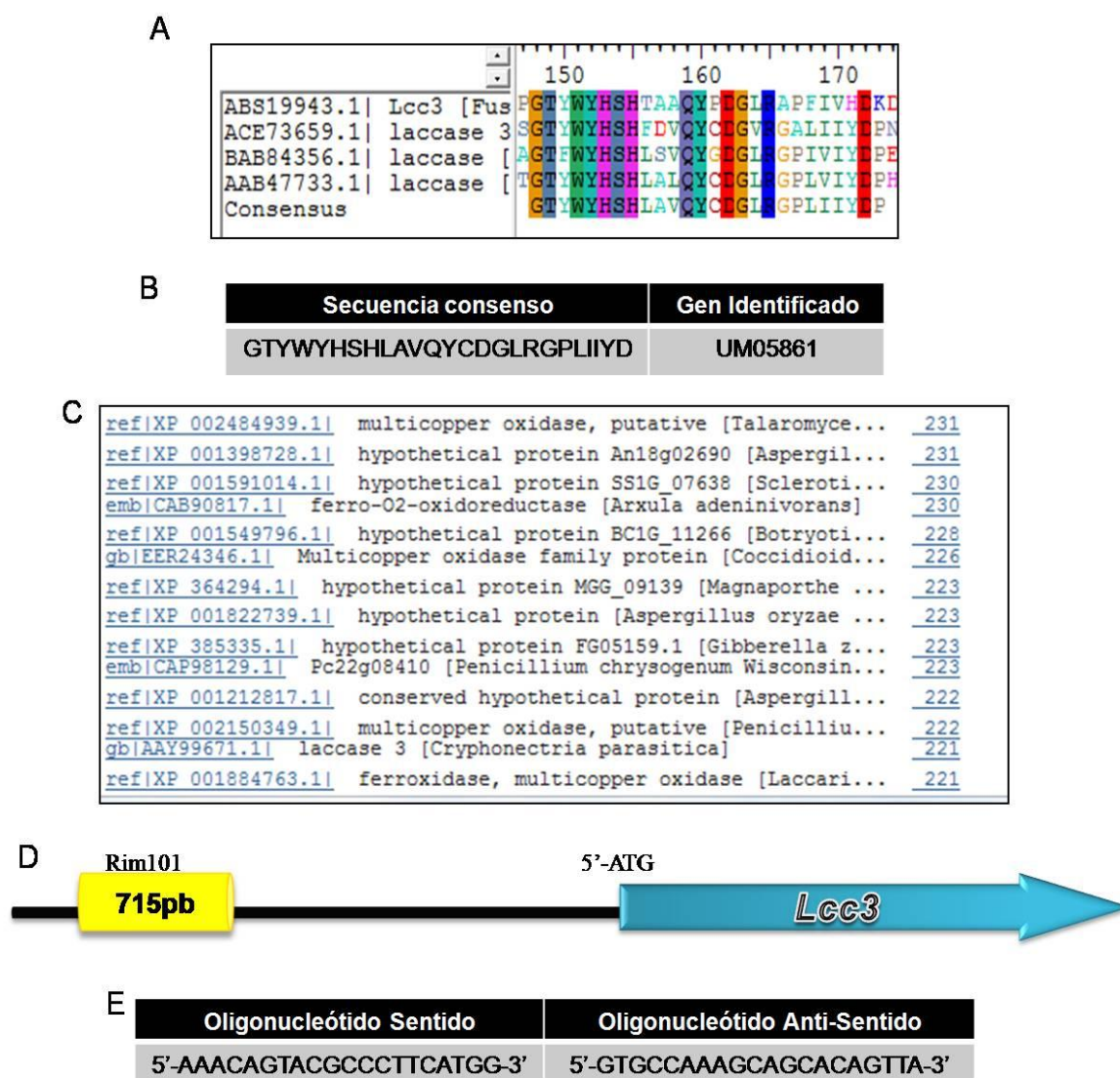
La figura 7 muestra las proteínas homologas de *Lcc3* descritas en otros hongos (Fig. 7a), que permitieron diseñar una sonda, la cual presentó homología con el gen UM05861 (Fig. 7b). La probable función se corroboró mediante comparación con proteínas obtenidas del NCBI y posteriormente se identificó el sitio de unión de Rim101 715pb hacia la región 5' del marco de lectura abierto (Fig. 7d). A continuación se diseñaron de los oligonucleótidos llamados RNALCC3F y LACRNEW. La Tabla 2 muestra las propiedades de los oligonucleótidos.

Para la identificación del gen de *Prb1* se usaron las secuencias de proteínas homologas descritas en otros hongos, cuyos números de acceso se pueden observar en la Fig. 8a, creando una sonda la cual alineo contra el gen UM04400 (Figura 8b). Se corroboró su probable homología al realizar un alineamiento contra la base de datos del NCBI, alineando exitosamente contra diversas proteasas vacuolares ya descritas (Fig. 8c). La regulación por Rim101 se corroboró localizando 2 sitios de unión 1809pb y 1994pb hacia la región 5' del ORF (Fig. 8d). Una vez hecho esto, se procedió al diseño de los oligonucleótidos denominados PRBRNAF y PRBRNAR (Fig. 9e). Las características de los oligonucleótidos se describen en la Tabla 2.





**Figura 7. Estrategia para la identificación *in silico* de *Prb1* en *U. maydis*.** A) Secuencia consenso de *Prb1* determinada a partir de secuencias homologas descritas en otros hongos, B) Secuencia consenso e identificación del probable homólogo de *Prb1* en *U. maydis*, C) Resultados del “Blast” en la base de datos de proteínas del NCBI para corroborar que la secuencia localizada coincidiera con la descrita para *Prb1* en *U. maydis*, D) Sitios de unión de Rim101 hacia la región 5’ del inicio del ORF, localizando 2 de ellos a 1809pb y 1994pb del ORF E) Oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación de *Prb1* en *U. maydis*.



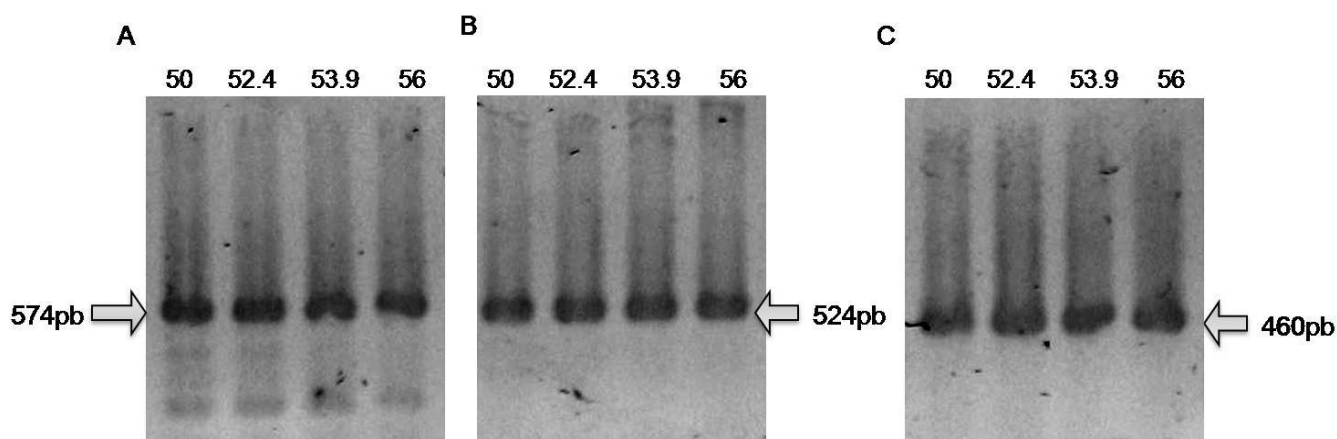
**Figura 8. Estrategia para la identificación *in silico* de *Lcc3* en *U. maydis*.** A) Secuencia consenso de *Lcc3* a partir de secuencias homologas descritas en otros hongos, B) Secuencia consenso e identificación del probable homólogo del gen *lcc* en *U. maydis*, C) Resultados del “Blast” con proteínas del NCBI para corroborar que el ORF localizado alinee con secuencias ya descritas para lacasas o *Lcc3* en *U. maydis*, D) Sitios de unión de Rim101 hacia la región 5’ del ORF, localizando un sitio a 715pb, E) Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen *Lcc3* de *U. maydis*.

**Tabla 2. Oligonucleótidos usados**

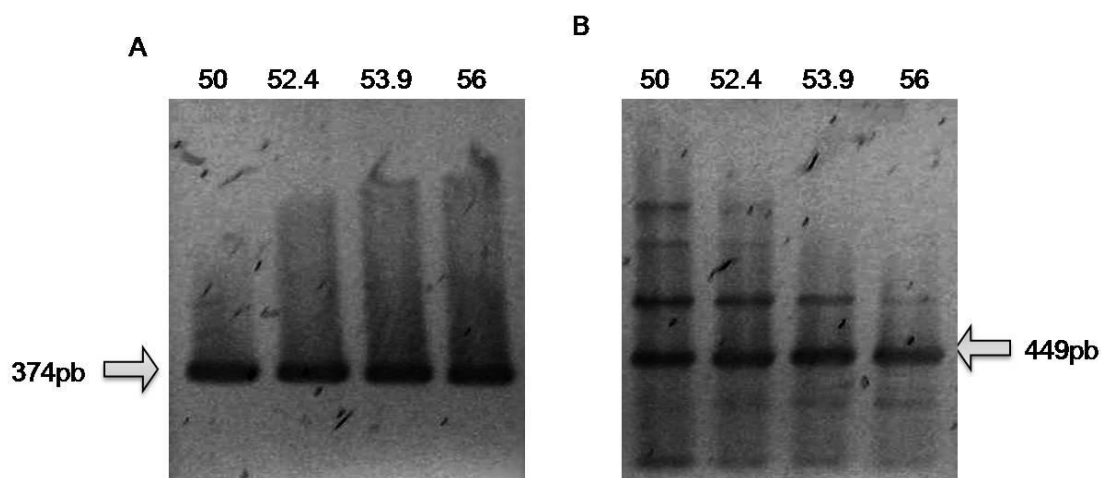
Nombre	Gen	Secuencia del oligonucleotido	Tm.	Tamaño del Fragmento Amplificado	Delta G kcal/mole
PFENA	<i>Ena1</i>	5'-CGGTGAAGATGTTGGTGTG-3'	56°C	449pb	-3.6
RENANEW	<i>Ena1</i>	5'-TAGTGATGGTGAGAACGGCA-3'			-3.61
RNALCC3F	<i>Lcc3</i>	5'-AAACAGTACGCCCTTCATGG-3'	55.5°C	374pb	-5.38
LACRNEW	<i>Lcc3</i>	5'-GTGCCAAAGCAGCACAGTTA-3'			-6.40
NRGRNAF	<i>Nrg1</i>	5'-ACTTGACCACCTCGACCTTG-3'	56°C	460pb	-6.76
RNANRGR	<i>Nrg1</i>	5'-AAAGGCGACACCATTCAATC-3'			-3.61
PRBRNAF	<i>Prb1</i>	5'-TCTAGCTGCCCTAGCTGCTC-3'	60.4°C	574pb	-6.34
PRBRNAR	<i>Prb1</i>	5'-GAAGGTGCTGAGACCGAGAC-3'			-4.41
RNASMP1F	<i>Smp1</i>	5'-TCCCAGCTTTATCTCGCCTA-3'	56°C	524pb	-6.34
SMP1RNAR	<i>Smp1</i>	5'-TTGTACTGACACCCACCGAA-3'			-3.65
ActinaF	<i>Actina</i>	5'-CTCBATCATGAAGTGTGA-3'	50°C	239 pb	-8.5
ActinaR	<i>Actina</i>	5'-BTGCTRYGARATCCACAT-3'			-6

### 8.5.- Estandarización de temperaturas medias.

La estandarización de temperaturas de amplificación nos dio como resultado las temperaturas de la Tabla 2. La figura 9 muestra el gradiente de PCR para *Prb1*, *Smp1* y *Nrg1*, usando DNA de *U. maydis* como molde para el PCR. Para los genes *Smp1* (Fig. 9b) y *Nrg1* (Fig.9c) la temperatura de amplificación es de 56°C, para *Lcc3* (Fig. 10a) fue de 55.5°C, pero para *Prb1*, se encontró una temperatura de alineamiento de 60.4°C, mostrando múltiples amplificados (Fig. 9a). Algo similar sucedió con el gen *Ena1* (Fig. 10b) cuya temperatura de amplificación es de 56°C y al igual que *Prb1* mostro múltiples bandas, tal vez debido a múltiples alelos no descritos o a que pertenece a una familia de proteasas, en el caso de *Prb1*.



**Figura 9.- Temperaturas de alineamiento de los genes *Prb1*, *Smp1* y *Nrg1*.** A) La estandarización nos dio una temperatura de alineamiento de 56°C para *Prb1*, pero análisis posteriores mostraron una mejor amplificación a 60.4°C, B) Los análisis nos indicaron que la temperatura idónea para el *Smp1* es de 56°C C) Esta misma temperatura se selecciono para el gen *Nrg1*

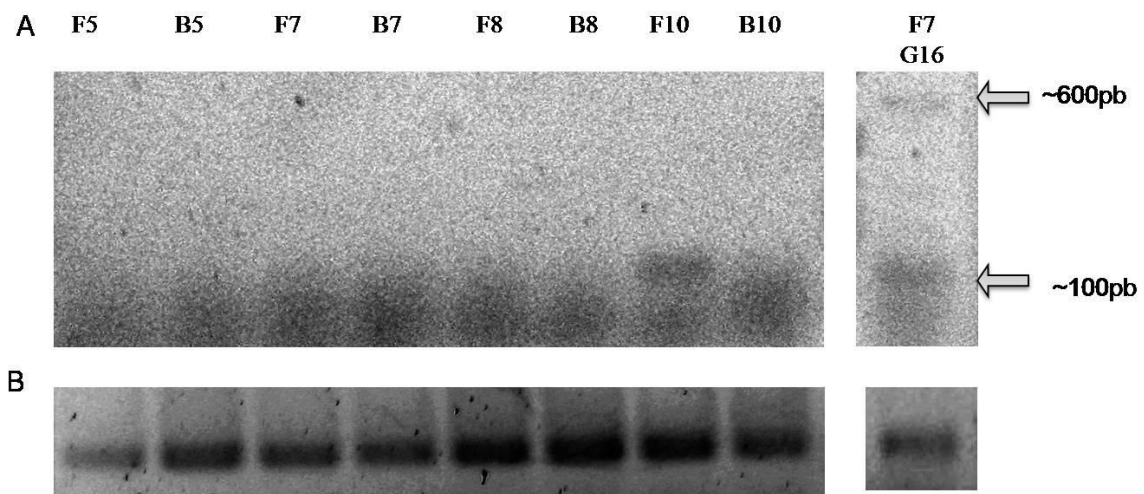


**Figura 10.- Temperaturas de alineamiento de los Genes *Lcc3* y *Ena1*.** A) La estandarización indico que la temperatura de alineamiento para *Lcc3* es de 56°C, pero análisis posteriores mostraron una mejor amplificación a 55.5°C, B) La estandarización para *Ena1* indico una temperatura de alineamiento de 56°C, son observables la amplificación de bandas inespecíficas, pudiera ser debido a la amplificación de alelos u otras bombas de sodio.

## 8.6.- Análisis de Expresión de Genes

### 8.6.1.-Lacasa, *Lcc3*

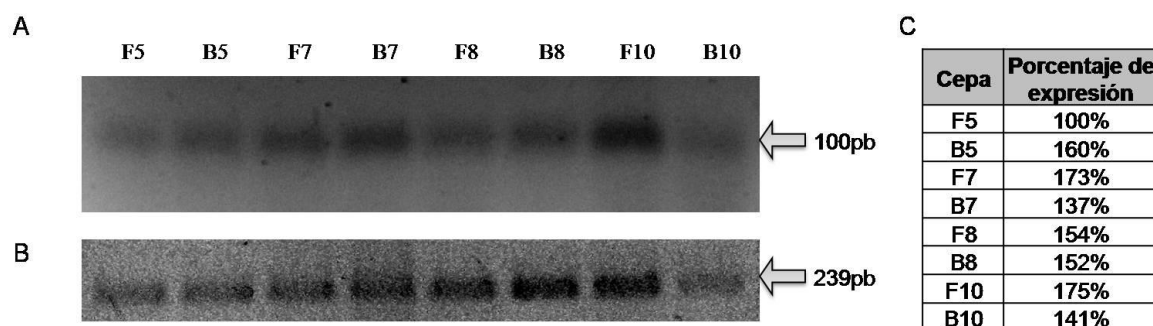
El gen *Lcc3* codifica para una Lacasa, para inducir su expresión se cultivo con Glicerol como única fuente de carbono, en estas condiciones solo amplifico una banda de 100pb en la cepa silvestre a pH 10. Este tamaño es inferior al esperado (374pb). (Fig. 11), cuando el pH es de 7 y después de 16 horas se observa la presencia de 2 bandas, una de un peso de 600pb (superior al esperado), y una de un peso similar a la observada en nuestra muestra de 22 horas. Esto lo podríamos explicar con posibles eventos de splicing alternativo.



**Figura 11. RT-PCR del gen *Lcc3* de muestras cultivadas en un medio con glicerol como fuente de Carbono.** A) Se observa la amplificación de una banda en la cepa FB2 a pH 10 de un tamaño aproximado de 100pb. En la muestra F7G16 (muestra cultivada en Glicerol por solo 16 horas) se observa otra banda de aproximadamente 600pb. B) Amplificación del transcrito de actina como control de carga

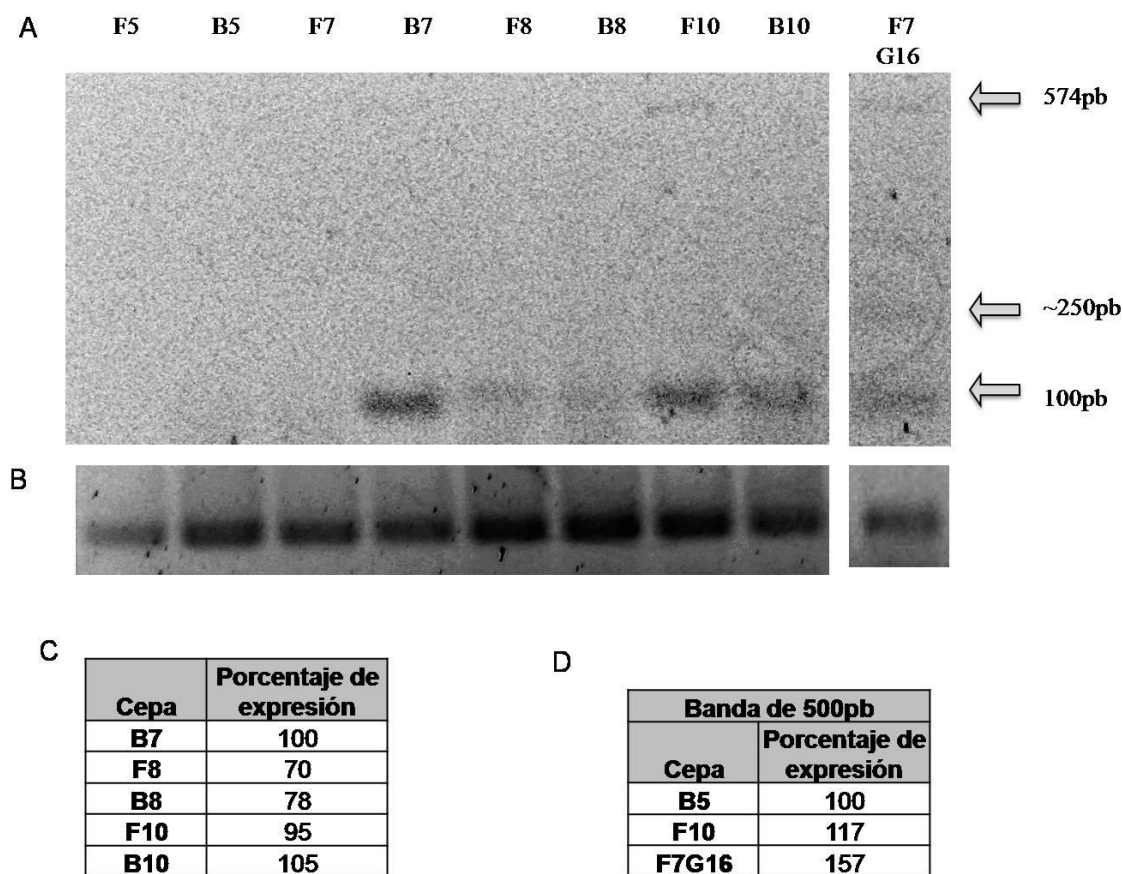
### 8.6.2.- Proteasa Vacuolar, *Pbr1*

La expresión de *Pbr1*, en con glucosa como fuente de carbono, de una banda de aproximadamente 100pb, dando indicios de splicing no reportados ya que se esperaba un amplificado de 574pb, amplificando en todas las muestras (Fig. 12), los análisis semicuantitativos del nivel de expresión muestran la represión de este gen por parte de Rim101 a pH5, expresándose un 60% más en la mutante nula para Rim101 (BMA) que en la silvestre en esa misma condición (Fig. 12a carril F5 y B5). A los pH's alcalinos existe una ligera sobreexpresión en FB2 comparado contra BMA, lo cual pudiese interpretarse como una estimulación parcial de la expresión de Rim101 sobre *Prb1*. La figura 12 muestra que Rim101 funciona como represor a pH ácido y como inductor a pH alcalino en un medio con glucosa como fuente de carbono.



**Figura.- 12. Análisis de la expresión del gen *Prb1*.** Se realizó el análisis de muestras cultivadas en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono. A) Transcripción reversa del gen homólogo de *Prb1* en *U. maydis* de aproximadamente 100pb en todas las muestras analizadas. B) Amplificación del transcrito de actina como control de carga, C) Análisis del nivel de expresión de este gen.

Para corroborar si la expresión de este gen se ve afectada por la fuente de carbono, se determinaron los niveles de expresión de este gen en muestras de células cultivadas en Glicerol (Fig. 13), los RNA provenientes de glicerol también presentaron un tamaño de banda inferior al esperado, amplificando exclusivamente a los pH 8 y 10 en ambas cepas y a pH7 solo en la cepa BMA, otra diferencia es la presencia de una banda de aproximadamente 570pb, la cual es del tamaño pronosticado, expresándose en la cepa BMA a pH7 y en FB2 a pH10. A la par se realizó el mismo análisis a la cepa FB2 creciendo a pH 7 en glicerol con 16 horas de crecimiento, observando la amplificación de 3 bandas, 1 de 100pb, otra de 574pb y una tercer banda de 200 pb. Los análisis de expresión de *prb1* muestran que Rim101 ejerce un efecto de represión en su expresión a pH 7 (Figura 13b).



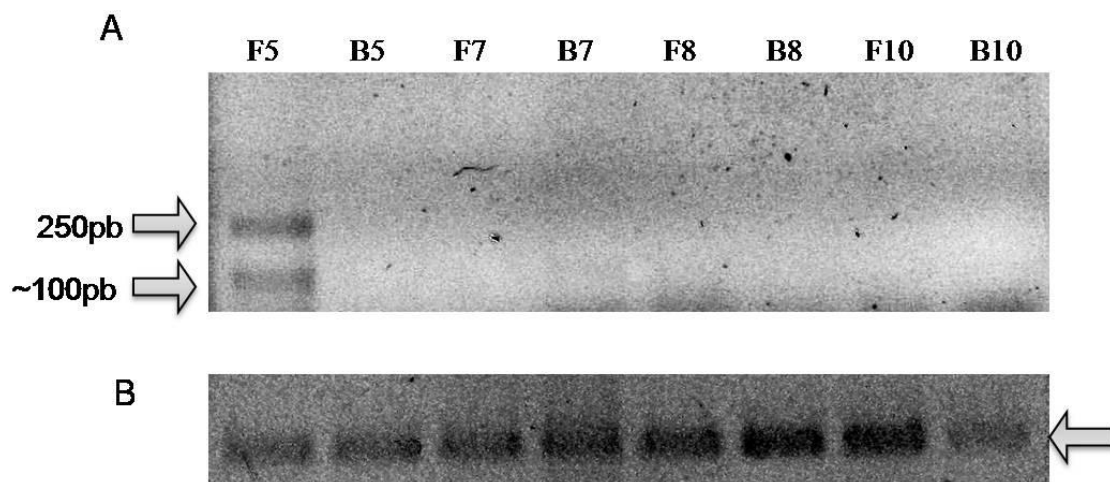
**Figura 13. Análisis de la expresión del gen *Prb1* de muestras con glicerol como fuente de carbono.** A) Transcripción reversa del probable gen homólogo de *Prb1* en *U. maydis*, observando una banda a 100pb en las muestras B7 a la B10 y F7G16, esta última muestra también presenta una banda de 250pb y otra de 574pb, la cual se llegó a ser observada en B7, F10. B) Amplificación del transcrito de actina como control de carga C) Análisis semicuantitativo del nivel de expresión de la banda de 100pb, observando la represión de la expresión por parte de Rim101 a pH alcalino, D) Análisis semicuantitativo del nivel de expresión de la banda de 574pb.

### 8.6.3- Bomba de Sodio, *Ena1*

Los análisis de la expresión de *Ena1* muestran que solo se transcribe a pH 5 de manera dependiente de Rim101. Se esperaba la amplificación de una banda de 449pb, pero



los resultados muestran la expresión de 2 bandas, una de 250pb y otra de alrededor de 100pb (Fig. 14).

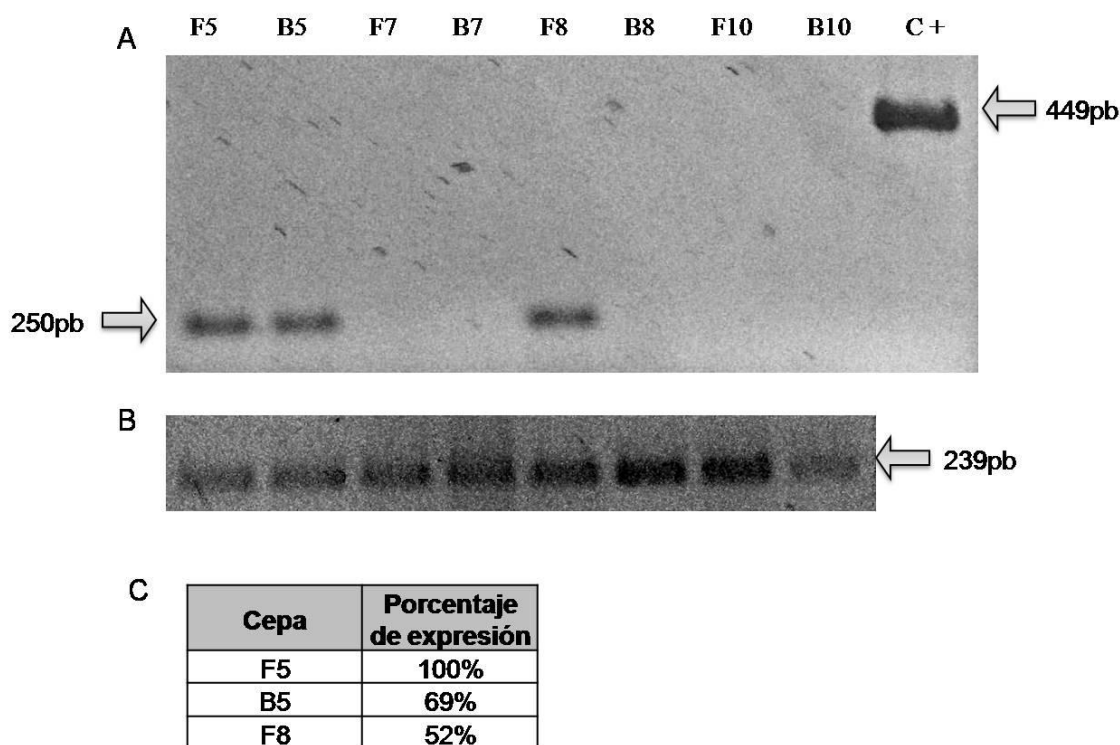


**Figura 14. Análisis de la expresión del transcrito de *Ena1*.** Se realizó el análisis de muestras cultivadas en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono, A) Se observa un amplificado de 250pb y otro de aproximadamente 100pb, inferiores al esperado de 449pb, amplificando solamente en FB2 a pH5. B) Amplificación de Actina como control de carga.

#### 8.6.4.- Factor transcripcional, *Smp1*

En la Figura 15 se muestra las condiciones en que se expresa *Smp1* en un medio con Glucosa como fuente de Carbono. El transcrito del gen *Smp1* solo se detectó a pH 5, expresándose de manera independiente de Rim101, pero su expresión a pH 8 si está regulada por este gen. Los análisis del nivel de expresión muestran una mayor expresión de *smp1* en FB2 a pH5 que BMA al mismo pH y su sola expresión en FB2 pH 8, esto sugiere que la estimulación de Rim101 es parcial a pH ácido, nula a pH 7 y 10 y extrañamente inductora de este gen a pH 8. Al igual que con los genes *Ena1*, *Prb1* y *Lcc3*, el gen *Smp1*

también amplifico una banda de tamaño distinto al esperado (524pb) amplificado presentó un tamaño de 200pb, lo cual se puede explicar debido a sitios de splicing alternativo no reportados.

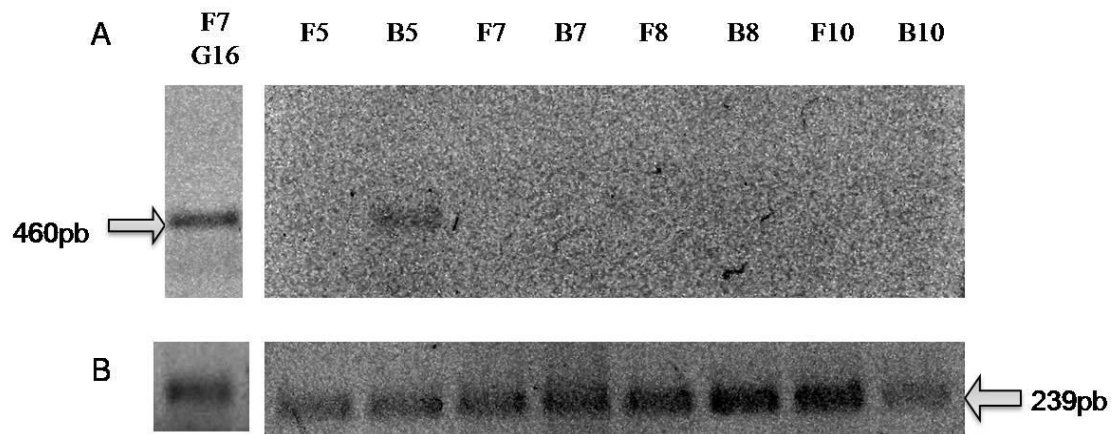


**Figura 15 Amplificación del transcrito de *Smp1*** A) Expresión de *Smp1*, en un medio de cultivo con glucosa, en las muestras F5 y F8 y B5. C+ es un PCR con DNA, mostrando el tamaño de banda pronosticado originalmente. B) Amplificación de Actina como control de carga. C) El nivel de expresión muestra una la regulación positiva de este gen, por parte de Rim101 a pH5.

#### 8.6.5.- Factor transcripcional, *Nrg1*:

Esta reportado que la expresión de *Nrg1* es reprimida en la presencia de glucosa en *S. cerevisiae*, debido a esto se procedió a realizar un RT-PCR de células de *U. maydis*

creciendo en glicerol, y encontramos (Fig. 16a) que la expresión de este factor transcripcional es reprimida por Rim101 exclusivamente a pH5 amplificando una banda de 460pb, exclusivamente en BMA mientras que a pH alcalino este gen no se expresa ni en FB2 ni en BMA. Análisis de la cepa FB2 en un punto más temprano en la fase logarítmica sugiere la expresión temprana de este gen (Fig. 16b).



**Figura 16.-Amplificación de *Nrg1* en un medio de cultivo con glicerol como fuente de carbono.** A) En un medio con glicerol, *Nrg1* se expresó solo en la mutante nula a y en la cepa silvestre a las 16h de cultivo (F7G16). B) Amplificación de Actina como control de carga.

## 9. DISCUSIÓN

En la última década, se ha consolidado el uso de *U. maydis* como un modelo de estudio debido, entre otras cosas a que su genoma está totalmente secuenciado ([www.broadinstitute.org/annotation/genome/ustilago\\_maydis/Home.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/ustilago_maydis/Home.html)). Esto ha permitido el hallazgo y estudio del factor transcripcional Rim101 (PacC) en este Basidiomiceto. Actualmente este factor transcripcional ha tomado importancia debido a su conservación en el reino, y a la regulación sobre genes involucrados en la virulencia, resistencia diferentes tipos de estrés, genes de floculación, diversas proteasas, etc. (Ver tabla 1). En el presente trabajo nos propusimos ubicar en el genoma y analizar la expresión de 5 genes homólogos cuya regulación por Rim101 se encuentre reportada en Ascomycetos y Deuteromicetos, y realizar un análisis pre-eliminar de la de la función de Rim101 en *U. maydis* en condiciones de pH a los cuales se cree que este factor transcripcional se encuentra activo y observar el efecto de la ausencia de de Rim101 sobre la expresión de estos. La selección de los genes estuvo fundamentada en su caracterizada regulación por Rim101 en otros hongos y a las características fenotípicas presentadas por la mutante nula  $\Delta$ Rim101 en *U. maydis* (Aréchiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, 2005) donde las cepas muestran principalmente: sensibilidad a estrés iónico, modificación en el patrón de deposición de septos, aumento de tamaño celular, y secreción de proteasas. En base a estos cambios fenotípicos, se estableció una relación con los genes reportados hasta el momento que se sabe son regulados por Rim101 en otros hongos y que se encuentran asociados a estas funciones, seleccionando los siguientes genes: *Ena1* se encuentra involucrado en la resistencia a estrés iónico causado por Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> a pH alcalino (Platara *et al* 2006). Se

selecciono este ultimo gen debido a 2 razones: 1) Debido a que la ausencia de Rim101 en *Ustilago maydis* causa una mayor susceptibilidad a sodio y a litio a pH alcalino (Aréchiga-Carvajal y Ruíz-Herrera, 2005), 2) *Ena1* no es regulado directamente por Rim101, pero si es reprimido por Nrg1p el cual a su vez se ha descrito es reprimido por Rim101 en *S. cerevisiae* (Lamb y Mitchell, 2003). Esto último nos llevo entonces a seleccionar al factor transcripcional *Nrg1*, que aparte de regular la expresión de *Ena1* se encuentra involucrado en el crecimiento a pH alcalino en *S. cerevisiae* así como regulando el metabolismo de carbohidratos (Lamb y Mitchell, 2003).

Otro gen seleccionado fue *Smp1* el cual, al igual que *Nrg1*, es un factor transcripcional regulado por Rim101, que regula negativamente el crecimiento haploide invasivo, la morfología colonial y esporulación, las mutantes en este gen pierden viabilidad durante la fase estacionaria de crecimiento *S. cerevisiae* (Lamb y Mitchell, 2003, Nadal *et al* 2003). Los últimos 2 genes fueron seleccionados aleatoriamente entre diversas proteasas y enzimas reguladas por Rim101, de entre estos el gen *Lcc3*, el cual pertenece a la familia de las Lacasas, que son enzimas que contienen cobre, que oxidan sustratos fenolicos y transfieren electrones al oxigeno (Mander *et al.*, 2006), estas enzimas son altamente usadas en la industria del papel, textil, y la panadería (Serna and Cuesta, 2008; Si Joan Qi 1994) y la proteasas vacuolar *Prb1*, que se encuentra involucrado en la degradación de las proteínas y es requerida durante la esporulación de *S. cerevisiae* (Zubenko *et al* 1981; Moehle *et al*, 1987; Teichert *et al* 1989).

La selección de genes nos llevo a la búsqueda de sus homólogos en el genoma de *U. maydis*, encontrando que Benito *et al.*, (2009) identificaron el gen *Ena1* en este hongo. Al evaluar el efecto de la presencia del factor de transcripción Rim101 en su expresión se

encontró que Rim101 estimula la expresión de *Ena1* a pH 5 exclusivamente en la cepa silvestre, respecto a la presencia de dos bandas en el RT-PCR se comprobó la especificidad *in silico* para el gen *Ena1*, deduciendo que pueden existir más de una copia de este gen, esta teoría se respalda con la figura 9b donde se puede observar que al realizar el PCR de estandarización, con DNA de la cepa silvestre FB2, la amplificación de una gran variedad de bandas de distinto tamaño. La regulación a pH ácido de *Ena1* por Rim101 contrasta con lo reportado hasta el momento en *F. oxysporum* y *S. cerevisiae* donde se menciona que la expresión de *Ena1* requiere un estrés iónico y un pH alto, siendo regulado por 3 rutas: 1.-la ruta pal/Rim, 2.-la vía Snf1 y 3.-La vía Calcineurina de de respuesta a Na, que genera una alcalinización intracelular (Platara *et al* 2006, Caracuel *et al.*, 2003, Ruiz *et al.*, 2003). Inclusive a pH 10 no se observó amplificación, donde se esperaba que al ser un pH alcalino alto se llegaría a activar la cinasa Snf1, la cual regula este gen y también genes reprimidos por glucosa (Sanzs, 2003; Platara *et al.*, 2006). El involucramiento de esta cinasa, sugiere que la expresión de *Ena1* requiere de una inducción por estrés osmótico nutritivo (Proft y Serrano, 1999). En *U. maydis* se demostró que este gen, es activo a pH ácido, de manera dependiente de Rim101, a pesar de ser un factor transcripcional cuya actividad se ha reportado de manera común a pH alcalino (Benito *et al.*, 2008).

La expresión de *Ena1* no se encuentra regulada directamente por Rim101, está asociada al factor transcripcional, llamado *Nrg1*, cuya expresión es regulada directamente por Rim101 (Lamb y Mitchell, 2003). Cuando analizamos la expresión del homólogo de *Nrg1* en *U. maydis* en un medio de cultivo con glicerol como fuente de carbono, ya que se ha reportado que *Nrg1* es reprimido por glucosa, observamos una elevación de los niveles de transcrito de *Nrg1* (Berkey *et al* 2004 Vyas *et al* 2005). Por otro lado, la estimulación de la expresión de *Nrg1* a pH ácido es reprimida por Rim101, contrastando con lo ya reportado

para este factor transcripcional de expresarse exclusivamente a pH alcalino. Esto sugiere que Rim101 es funcional a pH ácido en *U. maydis*. La falta de expresión de *Nrg1* a pH alcalino, a pesar de estar presente en un medio de cultivo sin glucosa, se puede deber a que este gen está regulado por otros factores de transcripción que responden a otros estímulos y cuya influencia en la expresión de este gen ya se ha reportado como la regulación por parte de la cinasa Snf1, que se ha sugerido que regula negativamente a *Nrg1* (Berkey *et al* 2004), la falta de regulación por la ruta del AMPc, la cual fosforila *Nrg1* en *Cryptococcus neoformans* permitiendo su correcta función (Cramer *et al.*, 2006), o la expresión temprana de este gen al observar la muestra con 16 horas de crecimiento (Figura 16). Existe una situación contradictoria en la expresión de *Nrg1* que solo se expresa a pH 5 en la mutante, pero a pH 7 en la silvestre, con 16h de crecimiento, esto último va en contra de lo que se sabe en otros sistemas. *Nrg1* no es el único factor transcripcional regulado por Rim101, también se ha reportado su influencia en la expresión del factor transcripcional *Smp1*. Los análisis muestran que en *U. maydis* Rim101 estimula la expresión de *smp1* hasta en un 30% a pH ácido (pH5) mientras que a pH alcalino (pH8), Rim101 estimula la expresión de *Smp1* en 56% comparado contra la misma cepa a pH5. Este efecto es específico de pH mencionados. Estos resultados contrastan con la función de Rim101 en *S. cerevisiae* de ser un represor de la expresión de *Smp1* (Lamb and Mitchel, 2003), lo cual indica la variabilidad en la función de esta proteína en *U. maydis*, y también del factor transcripcional *Smp1* y probablemente de las rutas asociadas a la expresión de este gen, como lo son las MAP cinasas y la ruta HOG (Dodou, E., y Treisman R. 1997; Nadal *et al* 2003).

Los primeros análisis de la Proteasa Vacuolar hipotética, *Prb1* en un medio con glucosa como fuente de carbono detectaron la expresión de un transcrito de menor peso

molecular a la esperado, esto puede deberse a que esta proteína pertenece a una familia de proteasas conservadas, por lo que uno o varios de sus miembros pueden ser regulados por Rim101, o a la expresión de alguna isoforma funcional en presencia de glucosa. Independientemente de cuál sea el caso, se puede observar la regulación ejercida por Rim101 sobre su expresión al reprimirlo a pH ácido (hasta un 60%) mientras que a pH alcalino el porcentaje de inducción de la expresión de *Pbr1* es dependiente del pH (Fig. 12b). La expresión de esta banda en todos los pH's, cuando la glucosa es la única fuente de carbono contrasta contra lo descrito en *S. cerevisiae* donde se han detectado solamente trazas de RNAm de *Prb1* durante el crecimiento exponencial en glucosa y aumenta su expresión cuando la fuente de carbono se agota, un ejemplo de esto se observa en *T. hammatum*, donde tanto *Prb1* como *Chit42* (una quitinasa) son co-regulados por una vía metabólica que responde a altas concentraciones de glicerol (Naik *et al* 1997, Steyaert *et al* 2004). El efecto del glicerol como fuente de carbono, en la regulación de este gen por Rim101, se da exclusivamente a pH alcalino. A pH 7 Rim101 actúa como un represor total de su expresión, hasta regular de forma parcial la expresión a pH más alcalinos. La expresión de un fragmento de aproximadamente 500pb en las muestras B7, F10 en glicerol, como fuente de carbono, y en la muestra F7G16 sugiere que la expresión de esta proteasa depende también de mecanismos regulatorios distintos a Rim101, que permiten la expresión del transcrito completo de *Prb1* a estos pH's. Al parecer la dependencia de Rim101 sobre la regulación de la expresión de esta proteasa ocurre solo a pH 10, sugiriendo que la expresión de *Pbr1* es regulada por factores extracelulares no reportados, ya que el análisis de la muestra F7G16 muestra la expresión de 3 amplificadores a las 16 horas de crecimiento, mientras que la expresión de este gen es nula en la esta cepa F7, pero con 22 horas de crecimiento. Estos factores extracelulares podrían ser desde desechos celulares hasta la falta de algún nutriente. Un análisis de expresión del gen *Prb1*



a distintos tiempos en su fase de crecimiento, puede darnos mayores indicios de la regulación de Rim101 sobre este gen y su probable función regulatoria en la expresión o represión de los transcritos más pequeños.

Al analizar la expresión de la lacasa *Lcc3* en glicerol como fuente de carbono, se observó la estimulación de la expresión a pH 10 de un transcrito de tamaño inferior al pronosticado, dando a pensar en un evento de splicing alternativo y la regulación por parte de otros factores de transcripción alternos a Rim101 obviamente estas aseveraciones tendrán que ser comprobadas mediante el análisis de las secuencias de los fragmentos amplificados. Cordoba *et al.*, (2008) realizaron el primer estudio para analizar la posible regulación de Rim101 sobre un grupo de lacasas, específicamente *Lcc3*, encontraron un solo sitio de unión de Rim101 a la región regulatoria de este gen, la comparación de los sitios de unión de Rim101 en la región promotora en *F. oxysporum* (1 sitio de unión de Rim101) y de su hipotético homólogo en *U. maydis* (2 sitios de unión de Rim101) hace pensar en una regulación más fuerte de parte de Rim101 sobre este gen en *U. maydis* que en *F. oxysporum*. Nuestros resultados sugieren la estimulación, por parte de Rim101, en la expresión del gen putativo *Lcc3* a pH 10 en *U. maydis*, al contrario de lo que se da en *F. oxysporum* en donde el homólogo de este mismo gen es reprimido a pH alcalino (Cordoba y Roncero, 2008), no descartamos, sin embargo la presencia de otras rutas de regulación involucradas en la expresión de este gen ya que el efecto de Rim101 por sí mismo no puede explicar la presencia de posibles isoformas en los transcritos

## 10. CONCLUSIÓN

Los homólogos en *Ustilago maydis* de los genes *Nrg1*, *Smp1*, *Prb1*, *Lcc3* y *Ena1* son regulados por el producto de la transcripción del gen *Rim101* de la siguiente forma:

- 1) Rim101 reprime la expresión de *Nrg1* a pH ácido (pH5) solo en presencia de glicerol como fuente de carbono.
- 2) Rim101 induce la expresión de *Ena1* a pH ácido (pH5) en presencia de glucosa como fuente de carbono.
- 3) Rim101 estimula la expresión del gen *Smp1* a pH ácido (pH5) y pH alcalino (pH8), en presencia de glucosa como fuente de carbono.
- 4) Rim101 induce la expresión del gen *Lcc3* a pH alcalino (pH10), esto contrasta contra lo ya reportado en *F. oxysporum*, y de forma dependiente de glicerol como fuente de carbono.
- 5) Rim101 reprime la expresión de *Prb1* a pH ácido y estimula su expresión a pH alcalino en presencia de glucosa como fuente de carbono. En glicerol como fuente de carbono Rim101 sucede lo contrario que con glucosa a pH alcalino.

Los análisis de expresión de estos genes sugieren, aparte de lo ya mencionado, la presencia de intrones no reportados en las bases de datos en los genes *Lcc3* y *Smp1*, o la probable regulación de Rim101 sobre varios alelos o miembros de una familia génica en los genes *Ena1* y *Prb1*.

Algunos de estos descubrimientos no coinciden del todo como es el caso de *Nrg1*, *Ena1* y *Lcc3* con los cuales nuestros hallazgos difieren con respecto a la función reportada para estos genes de Rim101 como activador de genes inducidos a pH alcalino, aun así explica muchos aspectos de Rim101p funcionando en otros organismos.

## 11. LITERATURA CONSULTADA

1. Arechiga-Carvajal, E.T. y Ruiz-Herrera, J. 2005. The *RIM101/pacC* Homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. American Society for Microbiology; 4:999-1008
2. Arst, H.N. Bignell, E. y Tilbum, J. 1994. Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet, 245:787-790.
3. Arst, H.N. y Peñalva, M.A. 2003. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. Trends Genet; 19:224-231.
4. Baek, YU. Martin, S.J. y Davis, D. 2006. Evidence for novel pH-dependent regulation of *Candida albicans* Rim101, a direct transcriptional repressor of the cell wall  $\beta$ -glycosidase Phr2. Eukaryot Cell; 5: 1550 - 1559.
5. Baek YU, Li M, y Davis, D.A. 2008. *Candida albicans* ferric reductases are differentially regulated in response to distinct forms of iron limitation by the Rim101 and CBF Transcription Factors. Eukaryot. Cell; 7: 1168 – 1179.
6. Banuett, F. 2002. Pathogenic development in *Ustilago maydis*. A progression of morphological transitions that result in tumor formation and teliospore production. In: Osiewacz HD, ed. Molecular Biology of Fungal Development. New York, USA. Marcel Dekker, 349-398.
7. Banuett, F. 1992. *Ustilago maydis*, the delightrul blight. TIG; 8:174-180.
8. Banuett, F. y Herskowitz, I. 1989. Different a alleles of *Ustilago mayáis* are necessary for maintenance of fílamentous growth but not for meiosis. Proc. Nati. Acad. Sci. USA; 86:5878- 5882

9. Banuett, F. y Herskowitz, I. 1996. Discrete developmental stages during teliospores formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*; 122: 2965-2976.
10. Barkani, AE. Kurzai, O. Fonzi, WA. Ramon, A. Porta, A. Frosch, M. y Muhlschlegel, F. 2000. Dominant Active alleles of Rim101 (PRR2) Bypass the pH Restriction on Filamentation of *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*; 20:4635-4647.
11. Barrales, RR. Jimenez, J. y Ibeas, JI. 2008, Identification of Novel Activation Mechanisms for FLO11 Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*; 178(1): 145–156.
12. Barret, K.J. Gold, S.E. y Kronstad, J.W. 1993. Identification and complementation of a mutation to constitutive filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol Plant Microbe Interact*; 6:274-283.
13. Basse, CW. Kolb, S. y Kahmann, R. 2002. A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*; 43: 75-93.
14. Benito, B. Garciadeblas, B. Pérez-Martín, J. y Rodríguez-Navarro, A. 2009. Growth at high pH, and sodium and potassium tolerance in above cytoplasmic pH media depend on ENA ATPases in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell*. 8:821-9
15. Berkey, C. Vyas, V. y Carlson, M. 2004. Nrg1 and Nrg2 transcriptional repressors are differently regulated in response to carbon source. *Eukaryotic cell*; 3:311-317
16. Blanchin-Roland, S. Da Costa, G. y Gaillardin, C. 2005. ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology*; 151:3627-3637.
17. Brachmann, A. Schirawski, J. Müller P. y Kahmann R. 2003. An unusual map kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J*. 22:2199-2210.

18. Bolker, M. 2001. *Ustilago maydis* a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. Microbiology; 147: 1395-1401.
19. Boyce K J, Chang H, D'souza C, kronstad J. W., 2005. An *Ustilago maydis* septin Is required for filamentous growth in culture and for full symptom development on Maize. Eukaryotic Cell, 4:2044-2056.
20. Boysen, JH. y Mitchell, Ap. 2006. Control of Bro-Domain Protein Rim20 Localization by External pH, ESCRT Machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 Pathway. Molecular Biology of the cell; 17:1344-1353.
21. Caddick, M.X. Brownlee, A.G. y Arst, H.N. 1986. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet.; 203:346-353.
22. Calcagno-Pizarelli, A.M. Negrete-Urtasun, S. Denison, S.H. Rudnicka, J.D. Bussink, H.J. Múnera-Huertas, T. Stanton, L. Hervás-Aguilar, A. Espeso, A.E. Tilburn, J. Arst, H.N. y Peñalva, M.A. 2007. Establishment of the ambient pH Signaling Complex in *Aspergillus nidulans*: PalI Assists Plasma Membrane Localization of PalH. Eukaryotic Cell; 6:2365-2375.
23. Caracuel, Z. Casanova, M.I.G. Roncero, A. Pietro, Di y Ramos, J. 2003. pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-type Na-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. Eukaryot Cell, 2:1246–1252.
24. Castillo-Lluvia, S. Alvarez-Tabarés, I. Weber, I. Steinberg, G. y Pérez-Martín, J. 2007. Sustained cell polarity and virulence in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* depends on an essential cyclin-dependent kinase from Cdk5/Pho85 family. Journal of Cell Science; 120:1584-1595
25. Chew, E. Aweiss, Y. Lu, C. y Banuett F. 2008. Fuz1, a MYND domain protein, is required for cell morphogenesis in *Ustilago maydis*. Mycologia; 100:31-46

26. Cordoba, D.C. y Roncero, M.I.G. 2008. Functional Analyses of Laccase Genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*; 98: 509-51.
27. Courty, PE. Hoegger, PJ. Kilaru, S. Kohler, A, Buee, M. Garbaye, J. Martin, F. y Kues, U. 2009. Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytol*, January 1; 182: 736-50.
28. Cramer, K. Gerrald, Q. Nichols, C. Prince, M. y Alspaugh, A. 2006. Transcription factor Nrg1 mediates capsule formation, stress response, and Pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*; 5:1147-1156.
29. Davis, D. Edwards, JE. Mitchell, AP. Ibrahim, AS. 2000. *Candida albicans* Rim101 pH Response Pathway Is required for Host-Pathogen Interactions. *Infection and Immunity*; 68:5953-5959.
30. Davis, D. Wilson, RB. y Mitchell, AP. 2000. Rim101-Dependent and –Independent Pathways Govern pH Responses in *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*; 20:971-978.
31. Denison, S.H. Negrete-Urtasun, S. Mingot, J.M. Tilburn, J. Mayer, W.A. Goel, A. Espeso, E.A. Peñalva M.A. y Arst, H.N.1998. Putative membrane components of a signal transduction pathway for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Sacharomyces* are homologous. *Mol. Microbiol.*; 30:259-264.
32. Denison, S.H. 2000. pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet. Biol.*; 29:61–71.
33. Denison, S.H. Orejas, M. y Arst, H.N. 1995. Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J. Biol. Chem.*; 270:28519-28522.

34. Diez, E. Alvaro, J. Espeso, E.A. Rainbow, L. Suárez, T. Tilburn, J. Arst H.N. y Peñalva, M.A. 2002. Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO; J.*, 21:1350-59.
35. Dodou, E. y Treisman, R. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-Box Transcription Factor RLm1 is a target for the MpK1 Mitogen-Activated protein Kinase Pathway. *Molecular and Cellular biology.* 17:1848-1859.
36. Eisendle, M. Oberegger, H. Buttinger, R. Illmer, P. y Haas, H. 2004. Biosynthesis and Uptake of Siderophores Is Controlled by the PacC-Mediated Ambient-pH Regulatory System in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*; 3:561-563.
37. Espeso, E.A. y Penalva M.A. 1996. Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J. Biol. Chem.*; 271:28825–28830.
38. Espeso, E.A. y Arst, H.N. 2000. On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol. Cell. Biol.*; 20:3355-3363.
39. Espeso, E. A. Tilburn, J. Sanchez-Pulido, C.V. Brown, A. Valencia, H. N. Arst H.N. y Penalva, M.A. 1997. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J. Mol. Biol.*; 274:466–480.
40. Feldbrügge, M. Kämper, J. Steinberg G. y Kahmann, R.T. 2004. Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr. Opp. Microbiol.*; 7:666-672.
41. Fernandez-Martinez, J. Brown, C.V. Diez, E. Tilburn, J. Arst, H.N. Peñalva M.A. y Espeso, E.A. 2003. Overlap of nuclear localization signal and specific DNA binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J. Mol. Biol.*; 334:667-684.



42. Ferreira-Nozawa, MS. Silveira. H.C. Ono, C.J. Fachin, A.L. Rossi, A. y Martinez-Rossi, N.M. 2006. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail in vitro. *Med Mycol*; 44: 641-5.
43. Flor-Parra, I. Vranes, M. Kamper, J. y Pérez-Martin, J. 2006. Biz1, a Zinc Finger Protein Required for plant invasión by *Ustilago maydis*, regulates the Levels of a Mitotic Cyclin. *The Plant Cell*; 18:2369-2387.
44. Galán, A. Casanova, M. Murgui, A. MacCallum, D.M. Odds, F.C. Gow, N.A.R. y Martínez, J.P. 2004. The *Candida albicans* pH-regulated *ker1* gene encodes a lysine/glutamic-acid-rich plasma-membrane protein that is involved in cell aggregation. *Microbiology*; 150:2641 - 2651.
45. Ghosh, S. Kebaara, B.W. Atkin, A.L. y Nickerson, K.W. 2008. Regulation of Aromatic Alcohol Production in *Candida albicans*. *Appl. Envir. Microbiol*; 74: 7211 - 7218.
46. González-Prieto, J.M. Domínguez, A. y Ruiz-Herrera, J. 2002. Cloning and disruption of the GCN5 homolog of *Yarrowia lipolytica*. VIII International Fungal Biology Conference. Guanajuato, Gto. Proceedings, pp71.
47. Gillissen, B. Bergemann, J. Sandmann, C. Schoroeer, B. Bolker, M. Kahmann, R. 1992. A two component regulatory system of self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell*; 68:1077-90.
48. Gustin, M.C. Albertyn, J. Alexander, M. y Davenport, K. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; 62: 1264-1300.
49. Herranz, S. Rodríguez, JM. Bussink, HJ. Sánchez-Ferrero, JC. Arts, HN. Peñalva, MA. y Vincent, O. 2005. Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *PNAs*; 102:12141-14146.

50. Hervás-Aguilar, A. Rodríguez, J.M. Tilburn. J. Arts, H.N. y Peñalva, M.A. 2007. Evidence for the Direct Involvement of the Proteasome in the Proteolytic Processing of the *Aspergillus nidulans* Zinc Finger Transcription Factor PAcC. The Journal of Biological Chemistry; 282:34735-34747.
51. Holliday, R. 1961. The genetics of *Ustilago maydis*. Genet. Res.; 2:204–230.
52. Ikeda, M. Kihara, A. Denpoh, A. y Igarashi, Y. 2008. The Rim101 Pathway is involved in Rsb1 Expression Induced by Altered Lipid Asymmetry. Molecular Biology of the Cell; 19:1922-193.
53. Kamper J, Kahmann R, Bölker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold S, Müller O, Perlin MH, Wösten HAB, Vries R, Ruiz-Herrera J, Reynaga-Peña CG, Snetselaar K, McCann M, Pérez-Martín J, Feldbrügge M, Basse CW, Steinberg G, Ibeas JI, Holloman W, Guzman P, Farman M, Stajich JE, Sentandreu R, González-Prieto JM, Kennell JC, Molina L, Schirawski J, Mendoza-Mendoza A, Greilinger D, Münch K, Rössel N, Scherer M, Vrane M, Ladendorf O, Vincon V, Fuchs U, Sandrock B, Meng S, Ho ECH, Cahill MJ, Boyce KJ, Klose J, Klosterman SJ, Deelstra HJ, Ortiz-Castellanos L, Li W, Sanchez-Alonso P, Schreier PH, Häuser-Hahn I, Vaupel M, Koopmann E, Friedrich G, Voss H, Schlüter T, Margolis J, Platt D, Swimmer C, Gnirke A, Chen F, Vysotskaia V, Mannhaupt G, Güldener U, Münsterkötter M, Haase D, Oesterheld M, Mewes HW, Mauceli EW, DeCaprio D, Wade CM, Butler J, Young S, Jaffe DB, Calvo S, Nusbaum C, Galagan J, Birren B. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. Nature; 444: 97-101.
54. Kanda, S. Aimi, T. Kano, S. Ishihara, S. Kitamoto, Y. y Morinaga, T. 2008. Ambient pH signaling regulates expression of the serine protease gene (*spr1*) in pine wilt

- nematode-trapping fungus, *Monacrosporium megalosporum*. Microbiol Res.;163:63-72.
55. Lamb, T.M. y Mitchell, A.P. 2003. The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *nrg1* and *smpl* in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol.; 23:677-686.
  56. Lamb, T.M. Xu, W. Diamond, A. y Mitchell, A. P. 2001. Alkaline Response Genes of *Saccharomyces cerevisiae* and Their Relationship to the RIM101 Pathway. Journal of Biological Chemistry; 276:1850–1856.
  57. Leuthner, B. Aichinger, C. Oehmen, E. Koopmann, E. Müller, O. Müller, P. Kahmann, R. Bölker M.y Schreirer P.H. 2005. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. Mol Gen Genomics; 272:639-650.
  58. Liang, Y. Gui, L. Wei, DS. Zheng, W. Xing, LJ. y Li, M.C. 2009. *Candida albicans* ferric reductase FRP1 is regulated by direct interaction with Rim101p transcription factor. FEMS Yeast Res; 9 2:270-277.
  59. Li, M. Martin, SJ. Bruno, VM. Mitchell, AP. y Davis, DA. 2004. *Candida albicans* Rim13p, a Protease Required for Rim101p Processing at Acidic and Alkaline pH's. Eukaryotic Cell; 3:741-751.
  60. Lotz, H. Sohn, k. Brunner, H. Muhlschlegel, FA. y Rupp, S. 2004. RBR1, a Novel pH-regulated cell wall gene of *Candida albicans*, is repressed by RIM101 an Activated by NRG1. Eukaryotic cell; 3:776-784.
  61. MacCabe, A.P. Van Den Hombergh, P.T.W. Tilburn, J. Arst H.N.y Visser, J. 1996. Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene PacC. A wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. Mol. Gen. Genet.; 250:367-374.

62. Maccheroni, W. May, G.S. Martinez-Rossi, N.M. y Rossi, A. 1997. The sequence of palF, an envirometal pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene*; 194:163-167.
63. Madzak, C. Blanchin-Roland, S. Cordero-Otero, R.R. y Gaillardin, C. 1999. Functional analysis of upstream regulating regions from the *Yarrowia lipolytica* XPR2 promoter. *Microbiology*; 145: 75 - 87.
64. Mansur, M. Suarez, T. y Gonzáles, A. 1998. Differential Gene expression in the laccase Gene Family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environmental Microbiology*. 64:771-774.
65. Martínez-Espinoza, A.D. León, C., Elizarraraz, G. y Ruiz-Herrera, J. 1997. Monomorphic nonpathogenic mutants of *Ustilago maydis*. *Phytopathology*; 87:259-265.
66. Martínez-Espinoza, A.D. y Ruiz-Herrera, J. 1998. Actualización: El hongo *Ustilago maydis*, de la época prehispanica al tercer milenio. *Fitopatología*; 33: 194-206.
67. Mander, G.J. Wang, H. Bodie, E. Wagner, J. Vienken, K. Vinuesa, C. Foster, C. Leeder, A.C. Vallen, G. Hammill, V. Janseen, G.G. Dunn-Coleman, N. Karos, M. Lemaire, H.G. Subknowski, T. Bollschweiler, C. Turner, G. Nusslein, B. y Fischer, R. 2006. Use of Laccase as a Novel, Versatile Reporter System in Filamentous Fungi. *Applied and Enviromental Microbiology*; 72:5020-5026.
68. Moehle, C. Aynardi, M. Kolodny, M. Park, F. y Jones, E. 1987. Protease B of *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation and regulation of the PRB1 Structural Gene. *Genetics*; 115: 255-263.
69. Moehle, C. Dixon, C. y Jones, E. 1989 Processing Pathway for Protease B of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology*; 108:309-324.
70. Molina, L. y Kahmann, R. 2007. AN *Ustilago maydis* Gene Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detoxification is required for virulence. *The Plant Cell*; 19:2293-2309.

71. Moreno-Mateos, MA. Delgado-Jarana, J. Codon, AC. y Benitez, T. 2007. pH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*. Fungal Genet Biol; 44: 1355-67.
72. Mingot, J.M. Espeso, E.A. Diez, E. y Peñalva, M.A. 2001. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. Mol. Cell. Biol.; 21:1688-1699.
73. Mingot, J.M. , Tilbyrn, J. Diez, E. Bignell, E. Orejas, O. Widdick, D.A. Sarkár, S. Brown, C.V. Caddick, M.X. Espeso, E.A. Arst H.N. y Peñalva, M.A. 1999. Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. Mol. Cell. Biol., 19:1390-1400.
74. Mira, NP. Lourenco, AB. Fernandes, AR Becker, JD y Sa-Correia, I. 2009. The RIM101 pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids. FEMS Yeast Res; 9 2:202-16.
75. Nadal, E. Casadome, L. Posas, F. 2003. Targeting the MEF2-Like Transcription Factor Smp1 by the Stress-Activated Hog1 Mitogen-Activated protein kinase; 23:229-237.
76. Naik, R. Nebes, V. Jones, E. 1997. Regulation of the Proteinase B Structural Gene PRB1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology; 179:1469-1774.
77. Negrete-Urtasun, S. Denison, S.H. y Arst, H.N. 1997. Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and Identification of possible homologs. J. Bacteriology; 179:1832-1835.
78. Negrete-Urtasun, S. Reiter, W. Diez, E. Denison, SH. Tilburn, J. Espeso, EA. Penalva, MA. y Arst, HN. 1999. Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. Mol Microbiol; 33(5): 994-1003.

79. Nobile, C.J. Solis, N. Myers, C.L. Fay, A.J. Deneault, J.S. Nantel, A. Mitchell, A.P. y Filler S.G. 2008. *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. *Cell Microbiol*; 10:2180-96.
80. Orejas, Mr. Espeso, E.A. Tilburn, J. Sarkar, S. Arst, H.N. y Peñalva, M.A. 1995. Activation of the *Aspergillus* pacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes and Dev.*; 9:1622-1632.
81. Pan, X. y Heitman, J. 1999. Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel. Biol.*; 19:4874-4887.
82. Park, SH. Koh, S.S. Chun, JH. Hwang, HJ. y Kang, HS. 1999. Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of STA1 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*; 19:2044-2050.
83. Peñalva, M.A. y Arst, H.N. 2004. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.*; 58:425- 451.
84. Peñalva, M.A., y Arst, H.N. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; 66:426-446.
85. Peñalva, M.A. Tilburn, J. Bignell, E. y Arts, H.N. 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology*; 16:291-300.
86. Peñas, MM. Hervás-Aguilar, A. Múñera-Huertas, T. Reoyo, E. Peñalva, MA. Arts, HN. y Tilburn, J. 2007. Further Characterization of the Signaling Proteolysis Step in the *Aspergillus nidulans* pH Signal Transduction Pathway. *Eukaryotick cell*; 6:960-970.

87. Poussereau, N. Creton, S. Billon-Grand, G. Rascle, C. y Fevre, M. 2001. Regulation of *Acp1*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiology*; 147: 717 – 72.
88. Platara, M. Ruiz, A. Serrano, R. Palomino, A. Moreno, F. Ariño, J. 2006. The transcriptional Response of the Yeast Na<sup>+</sup> -ATPase ENA1 Gene to Alkaline Stress Involves Three Main Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry*; 281: 36632-36642.
89. Reichmann, M. Jamnischek, A. Weinzierl, G. Ladendorf, O. Huber, S. Kahmann, R. y Kamper, J. 2002. The histone deacetylase Hda1 from *Ustilago maydis* is essential for teliospore development. *Mol Microbiol*; 46:1169-1182.
90. Rodríguez-Galan, O. Galindo, A. Hervás-Aguilar, A. Arts, HN. y Peñalva, MA. 2009. Physiological Involvement in pH Signaling of Vps24-mediated Recruitment of *Aspergillus* PalB Cysteine Protease to ESCRT-III. *Journal of Biological Chemistry*; 284:4404-4412.
91. Rollins, J.A. y Dickman, B. 2001. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a *pacC/RIM1* homolog. *Appl. Environ. Microbiol*; 67:75–81.
92. Rothfels, K. Tanny, JC. Molnar, E. Friesen, H. Commisso, C. y Segall, J. 2005. Components of the ESCRT Pathway, DFG16, and YGR122w are required for Rim101 to act as a corepressor with Nrg1 at the negative Regulatory element of the D1T1 Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*; 25:6772-6788.
93. Ruiz-Herrera, J. Leon-Ramirez, C. Cabrera-Ponce, CL. Martinez-Espinoza, AD. y Herrera-Estrella, L. 1999. Completion of the sexual cycle and demonstration of genetic recombination in *Ustilago maydis* in vitro. *Mol Gen Genet*; 262: 468-72.

94. Ruiz-Herrera, J. León, C.G. Guevara-Olvera, L. y Cáravez-Tejo, A. 1995. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. Microbiol; 141:695-703.
95. Ruiz, A. Yenush, L. y Ariño, J. 2003. Regulation of Enal Na<sup>+</sup>ATPase Gene expression by Ppz1 Protein Phosphatase is mediated by the calcineurin Pathway. Eukaryotic Cell; 2:937-948.
96. Sambrook, J. Russell, DW. y Sambrook, J. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Volume 1, Chapter 6, pp. 6.31-6.33
97. Sanz P. 2003. Snf1 protein kinase: a key player in the response to cellular stress in yeast. Biochemical Society Transactions; 31:178-181.
98. Scherer, M. Heimel, K. Starke, V. y Kamper, J. 2006. The Clp1 protein is required for clamp formation and the Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. The Plant cell; 18:2388-2401.
99. Schulz, B. Banuett, F. Dahl, M. Schlesinger, R. Schäfer, W. Martin, T. Herskowitz, I. y Kahmann, R. 1990. The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. Cell; 60:295-306.
100. Serna, L.C. y Cuesta, F.L.A. 2008. Use of laccase-producing microorganisms in membrane systems for polluting agent's removal: consideration and perspectives. Chilean Journal of Agricultural Research; 68:401-411.
101. Si Joan Qi. 1994. Uso de Lacasa en Panaderia. Número de Patente Europea 94918312.3, 27-03-1996.
102. Snetselaar, K. M. y Mims, C.W. 1992. Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. Mycologia; 84, 193-203.



103. Steyaert, J. Stewart, A. Jaspers, M. Carpenter, M. y Ridgway, H. 2004. Co-expression of two genes, a chitinase (*Chit42*) and proteinase (*prb1*) implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hammatum*. *Mycologia*; 96:1245-1252.
104. Sorimachi, H. y Suzuki, K. 2001. The structure of calpain. *J. Biochem*; 129:653-664.
105. Su, SS. y Mitchell, AP. 1993. Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics*; 133:67-77.
106. Szanislo, PJ. 1985. Fungal Dimorphism with Emphasis on Fungi Pathogenic for Humans. New York, ed. Plenum Press.
107. Teichert, U. Mechler, B. Muller, H. y Wolf, D.H. 1989. Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J. Biol. Chem*; 264: 16037 - 16045.
108. Thevelein, J.M. y de Winde, J.H. 1999. Novel sensing mechanism and targets for the cAMP- protein-kinase a pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol*; 33:904- 918.
109. Tilburn, J. Sanchez-Ferrero, J.C. Reoyo, E. Arst, H.N. y Peñalva, M.A. 2005. Mutational Analysis of the pH Signal Transduction Component PalC of *Aspergillus nidulans* Supports Distant Similarity to BRO1 Domain Family Members. *Genetics*; 171: 393–401.
110. Tilburn, J. Sarka, S. Widdick, D.A. Espeso, E.A. Orejas, M. Mungroo, J. Peñalva M.A. y Arst, H.N. 1995. The *Aspergillus* pacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline- expressed genes by ambient pH. *EMBO J*; 14:779-790.

111. Vankuyk, PA. Diderich, JA. MacCabe, AP. Hererro, O. Ruijter, GJ. y Visser, J. 2004. *Aspergillus niger mstA* encodes a high-affinity sugar/H<sup>+</sup> symporter which is regulated in response to extracellular pH. *Biochem J*; 379: 375-83.
112. Villar, CC. kashleva, H. Nobile, CJ. Mitchell, AP. y Dongari-Batzoglou, A. 2007. Mucosal Tissue Invasion by *Candida albicans* is associated with E. cadherin Degradation, Mediated by Transcription Factor Rim101p and Protease Sap5p. *Infection and Immunity*; 75:2126-2135.
113. Vincent, O. Rainbow, L. Tilburn, J. Arst, H.N. y Peñalva, M.A. 2002. YPXL I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* palA and its human homologue AIPI/Alix. *Mol. Cell. Biol*; 23:1647-1655.
114. Vyas, V. Berkey, C. Miyao, T. y Carlson, M. 2005. Repressors Nrg1 and Nrg2 regulate a Set of stress-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*; 4:1882-1891.
115. You, BJ. y Chung, KR. 2007. Phenotypic characterization of mutants of the citrus pathogen *Colletotrichum acuatum* defective in a PacC-mediated pH regulatory pathway. *FEMS Microbiol*; 277:107-114.
116. Young, T.W. Wadeson, A. Glover, D.J. Quincey, V. Butlin, M.J. y Kamei, E.A. 1996. The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica*: sequence and pH-regulated transcription. *Microbiology*; 142: 2913 – 2921.
117. Zhu, X. Gibbons, J. Garcia-Rimera, J. Casadevall, A. Williamson, P. 2001. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infection and Immunity*; 69: 5589-5596.
118. Zubenko, G. y Jones, E.W. 1981. Protein degradation, meiosis and sporulation in proteinase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*; 97: 45-64.